1954

INSTITUUT VOOR PLANTENZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK

WAGENINGEN, NEDERLAND

DIRECTEUR: Dr J. G. TEN HOUTEN

MEDEDELING No 85

ONDERZOEKINGEN OVER VIRUSZIEKTEN VAN DE BOON (PHASEOLUS VULGARIS L.)

WITH A SUMMARY

INVESTIGATIONS ON VIRUS DISEASES OF THE BEAN (PHASEOLUS VULGARIS L.)

DOOR

J. P. H. VAN DER WANT

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
9 FEB 1956

INSTITUUT VOOR PLANTENZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK (I.P.O.)

Office and main laboratory:	Binnenhaven 4*a*, tel. 2151/52, Wageningen, Netherlands.
Staff:	
Director:	Dr J. G. TEN HOUTEN.
Head of the Entomological Dept.:	Dr H. J. DE FLUITER, Wageningen.
Head of the Virological Dept.:	Prof. Dr T. H. THUNG, Wageningen.
Head of the Mycological Dept.:	Ir J. H. VAN EMDEN, Wageningen.
Head of the Nemathological Dept.:	Dr Ir J. W. SEINHORST, Wageningen.
Head of the Plant Disease Resistance Dept.:	Dr J. C. S'JACOB, Wageningen.

Researchworkers at the Wageningen Laboratory:

Miss Ir M. BAKKER, Phytopathologist
Ir A. B. R. BEEMSTER, Virologist
Ir A. M. VAN DOORN, Phytopathologist
Drs H. H. EVENHUIS, Entomologist
Dr H. J. DE FLUITER, Entomologist
Dr Ir J. J. FRANSEN, Entomologist
Dr J. GROSJEAN, Phytopathologist
Ir H. A. VAN HOOF, Phytopathologist
Ir N. HUBBELING, Phytopathologist and plantbreeder
Dr J. C. S'JACOB, Phytopathologist and plantbreeder
Miss Dr C. H. KLINKENBERG, Nematologist
Miss Dra J. M. KRIJTHE, Phytopathologist
Ir R. E. LABRUYÈRE, Phytopathologist
Dr J. C. MOOI, Phytopathologist
Dr D. MULDER, Phytopathologist
Dr D. NOORDAM, Phytopathologist
Miss Dra F. QUAK, Phytopathologist
Dr Ir J. W. SEINHORST, Nematologist
Ir F. H. F. G. SPIERINGS, Plantphysiologist
Prof. Dr T. H. THUNG, Virologist
Dr J. P. H. VAN DER WANT, Virologist

Researchworkers elsewhere:

Dr Ir C. J. H. FRANSSEN, Entomologist }
Drs L. E. VAN 'T SANT, Entomologist } „Entomologisch Lab. I.P.O.", Mauritskade 59*a*, A'dam-O, tel. 56282.

Dr W. J. MAAN, Entomologist, van IJsselsteinlaan 7, Amstelveen, tel. 2451.

Ir G. S. ROOSJE, Phytopathologist }
Drs D. J. DE JONG, Entomologist } detached to „Proefstation voor de Fruitteelt in de volle grond", Wilhelminadorp, tel. 2261, Goes.

Drs G. SCHOLTEN, Phytopathologist, detached to „Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland" Aalsmeer, tel. 688.

Dr F. TJALLINGII, Phytopathologist/Virologist, detached to „Proeftuin Noord Limburg" Venlo, tel. K 4700–2503.

Guest workers:

Prof. Dr D. J. KUENEN, Entomologist, „Zoölogisch Laboratorium", University, Leiden, tel. 20259.

Dr Ir G. S. VAN MARLE, Entomologist, Diepenveenseweg 226, Deventer, tel. 3617.

Prof. Dr J. DE WILDE, Entomologist, „Laboratorium voor Entomologie", Agricultural University, Wageningen, tel. 2438.

Aphidological Adviser:

Mr D. HILLE RIS LAMBERS, Entomologist T.N.O., Bennekom, tel. 458.

ONDERZOEKINGEN OVER VIRUSZIEKTEN VAN DE BOON
(*PHASEOLUS VULGARIS* L.)

Investigations on virus diseases of the bean
(*Phaseolus vulgaris* L.)

DOOR

DR J. P. H. VAN DER WANT

H. VEENMAN & ZONEN - WAGENINGEN - 1954

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/mededeling-instituut-voor-plantenziektenkundig-onderzoek_1954_85

INHOUD

1. Algemene inleiding 1

2. De *Phaseolus-viren 1* en *2* 2
   2.1. Inleiding 2
   2.2. *Phaseolus-virus 1* 4
      2.2.1. Symptomen en waardplantenreeks 4
      2.2.2. Eigenschappen in vitro 10
      2.2.3. Overbrenging door *Myzus persicae* Sulz. en *Aphis fabae* Scop. 11
      2.2.4. Optreden en verspreiding in het veld 13
   2.3. *Phaseolus-virus 2* 17
      2.3.1. Symptomen en waardplantenreeks 17
      2.3.2. Eigenschappen in vitro 20
      2.3.3. Overbrenging door *Myzus persicae* Sulz. en *Aphis fabae* Scop. 20
      2.3.4. Optreden en verspreiding in het veld 22

3. Het witteklavervirus 26
   3.1. Inleiding 26
   3.2. Symptomen en waardplantenreeks 27
   3.3. Eigenschappen in vitro en serologie 28
   3.4. Overbrenging door *Myzus persicae* Sulz. en *Aphis fabae* Scop. . . 30

4. Onderzoekingen over de overbrenging van twee stammen van *Phaseolus-virus 1* door de bladluizen *Myzus persicae* Sulz. en *Aphis fabae* Scop. . 31
   4.1. Inleiding 31
   4.2. Algemene methode van onderzoek 33
   4.3. De proeven en hun resultaten 35
      4.3.1. Over het optreden van een locale reactie 35
      4.3.2. Gebruik van toetsplanten van verschillende leeftijd 36
      4.3.3. Hoeveel planten kan *Myzus persicae* Sulz. besmetten na *Phaseolus-virus 1* stam RM te hebben opgenomen? 37
      4.3.4. Heeft de leeftijd van de besmettingsbron invloed op het vermogen van de luis het virus op te nemen? 40
      4.3.5. Analyse van de overbrenging van *Phaseolus-virus* 1 door *Myzus persicae* Sulz. en *Aphis fabae* Scop. 41

5. Zuivering van de bonenviren ten behoeve van electronenmicroscopie . 50
   5.1. Inleiding 50

5.2. Resultaten van het onderzoek 51
5.2.1. Invloed van centrifugeren op de besmettelijkheid van sap . 52
5.2.2. Sedimentatie van de *Phaseolus-viren 1* en *2* in de ultracentrifuge 52
5.2.3. Gebruik van bloedingssap voor electronenmicroscopisch onderzoek 53
5.2.4. Toepassing van papierchromatografie voor de zuivering van de bonenviren 54

6. Samenvatting 58

7. Summary 59

8. Literatuur 70

Aanhangsel I. Reactie van een aantal bonenrassen op de *Phaseolus-viren 1* en *2* 73

Aanhangsel II. Resultaten van 13 series proeven betreffende de overbrenging van de *Phaseolus-virus 1*-stammen W en RM met behulp van *Myzus persicae* Sulz. en *Aphis fabae* Scop. . 75

„Wetenschappelijk werk is voor een groot deel het leveren van kleine bijdragen tot een groot patroon; deze bijdragen zetten werk van vele voorgangers voort en zijn door ontelbare schakels verbonden aan het werk van anderen."

J. TINBERGEN

1. ALGEMENE INLEIDING

In dit geschrift worden onderzoekingen beschreven, die over enige virusziekten van de boon zijn verricht. Het betreft het *Phaseolus-virus 1*[1]) (verder aangeduid als PV1), dat in Nederland ook als rolmozaiekvirus bekend staat en een uitgebreid verspreidingsgebied heeft. Voorts het *Phaseolus-virus 2*[1]) (verder aangeduid als PV2), dat minder algemeen voorkomt, doch in de gevallen, dat er ziekte door teweeg wordt gebracht tot belangrijke schade aanleiding kan geven. Van beide viren zijn twee stammen bestudeerd en onderling vergeleken. Het derde virus, dat ter sprake zal komen is afkomstig van witte klaver. Voor zover bekend, treedt het in de practijk niet bij boon op, maar in de kas kan het met sap gemakkelijk op deze plant worden overgebracht. Voor bepaalde onderzoekingen van PV1 en PV2 heeft dit witteklavervirus (verder aangeduid als WKV) als vergelijkingsobject dienst gedaan. Daarom is het in deze studie opgenomen en wordt een hoofdstuk aan zijn eigenschappen, waardplantenreeks, e.d. gewijd.

De drie genoemde viren kunnen door bladluizen worden overgebracht. In de loop van het onderzoek bleek PV1 zich goed te lenen voor een uitvoeriger bestudering aangaande zijn overbrenging door de bladluissoorten *Myzus persicae* Sulz. en *Aphis fabae* Scop. De proeven, die hierop betrekking hebben worden in een volgend hoofdstuk besproken, waarin tevens een beschouwing over de overbrenging van non-persistente viren door bladluizen zal worden gegeven.

Ten slotte werd getracht de viren te zuiveren ten behoeve van electronenmicroscopie. De daarbij opgedane ervaringen zijn in het laatste hoofdstuk vastgelegd.

De hier te beschrijven onderzoekingen hadden zich over een breder terrein kunnen uitstrekken. Zo is geen onderzoek verricht over anatomie en cytologie van de aangetaste bonenplanten, terwijl de serologie van de drie viren uitgebreider bestudeerd had kunnen worden.

De resultaten van veldproeven, die enige jaren werden genomen om de vatbaarheid en gevoeligheid van verscheidene rassen van landbouwstambonen en van in de tuinbouw geteelde bonen voor PV1 en PV2 te toetsen, zijn in Aanhangsel I samengevat. Uitgebreidere gegevens aangaande een groter aantal rassen zijn te vinden in een verhandeling van HUBBELING, die binnenkort zal verschijnen.

[1]) Volgens de nomenclatuur van SMITH (1937).

2. DE PHASEOLUS-VIREN 1 EN 2

2.1. Inleiding

Door FRANDSEN (1952) is onlangs een zeer uitvoerige samenvatting van de literatuur over viren van de boon gegeven. Derhalve wordt hier volstaan met een summier overzicht.

De *Phaseolus-viren 1* en *2* zijn in verscheidene landen gesignaleerd. Over het optreden van PV1 bestaan wel de meeste gegevens. HARTER & ZAUMEYER (1944) leveren een opsomming van de vele landen, waar dit virus voorkomt. Reeds RANDS & BROTHERTON (1925) hebben het optreden in verscheidene landen op indirecte wijze kunnen aantonen door het uitzaaien van monsters bonen, uit allerlei streken afkomstig. Zij namen toen secundair besmette planten waar in een groot aantal van deze monsters. Het is nl. bekend, dat dit virus via het zaad op een deel van de nakomelingschap van een zieke plant kan worden overgebracht (REDDICK & STEWART, 1919) en aldus kon worden besloten, dat het virus aanwezig was in de landen, waar het zaad vandaan kwam.

Over het voorkomen van PV2 is minder bekend. Het is in de Verenigde Staten waargenomen (HARTER & ZAUMEYER, 1944) en in Europa, buiten Nederland, in Duitsland (QUANTZ, 1951) gevonden. Voor zover bekend gaat dit virus niet met het zaad van een besmette bonenplant over. PV2 kan verscheidene plantensoorten aantasten, waartoe niet slechts vlinderbloemigen (ZAUMEYER & WADE, 1935), maar ook *Gladiolus* (MCWHORTER, BOYLE & DANA, 1947) en *Freesia* (VAN KOOT, VAN SLOGTEREN, CREMER & CAMFFERMAN, 1945) behoren.

Aangaande PV1 is door sommige, vnl. vroegere auteurs (b.v. MERKEL, 1929; NELSON, 1932; PIERCE, 1934) wel beweerd, dat dit ook andere vlinderbloemigen zou kunnen besmetten. FAJARDO (1930a) was daarentegen niet in staat het virus op andere plantensoorten dan boon over te brengen. Ook ZAUMEYER & WADE (1933) konden van 16 genera uit de Leguminosae slechts *Phaseolus vulgaris* besmetten. Tegenwoordig wordt aangenomen, dat PV1 inderdaad beperkt is tot deze soort en tot enkele nauw-verwante *Phaseolus*-soorten (FRANDSEN, 1952).

Van beide viren is het voorkomen van verschillende stammen beschreven. Zo kent men stammen, die verschillen in de hevigheid van symptomen, die bij bepaalde bonenrassen teweeg worden gebracht (FRANDSEN, 1952). Deze auteur vond tevens, dat de ene van de twee door hem onderzochte stammen in staat was twee bonenrassen te besmetten, die resistent waren tegen de andere. Een soortgelijk verschijnsel, dat bonenrassen, resistent tegen een bepaalde PV1-stam, voor een andere stam vatbaar zijn, werd reeds in de Verenigde Staten waargenomen (RICHARDS & BURKHOLDER, 1943). Van PV2 zijn stammen bekend, die bij bepaalde bonenrassen meer of minder geprononceerde symptomen van mozaiek verwekken, doch er is ook een stam beschreven, die bij dezelfde rassen tot een hevige necrose aanleiding geeft (GROGAN & WALKER, 1948b).

Uit het voorgaande blijkt reeds, dat verschillende typen van symptomen kunnen optreden, hetgeen bepaald wordt door de stam van het virus, doch tevens in sterke mate door de eigenschappen van de bonenrassen. Het is duidelijk, dat de schade, die door de viren wordt berokkend, afhankelijk is van de wijze, waarop

de besmette plant reageert. Dat hierbij ook het tijdstip van besmetting, gerekend naar de ontwikkeling van de plant, betekenis heeft, zal blijken. Interessant is het verschijnsel van hevige necrose, dat bij bepaalde zgn. tegen PV1 resistente bonenrassen optreedt en dat hier te lande als zwartevaatziekte bekend staat. Dit ziektebeeld werd door JENKINS (1940, 1941) beschreven; later bleek het verklaard te kunnen worden als een soort van overgevoeligheidsverschijnsel op PV1, dat alleen onder bepaalde omstandigheden optreedt (GROGAN & WALKER, 1948c; KLINKOWSKI & BEHR, 1953). Door BRIDGMON & WALKER (1951) werd aangetoond, dat een soortgelijke reactie kan voorkomen onder invloed van het zgn. zuidelijk-bonenmozaiekvirus („southern bean mosaic virus"), dat voorzover bekend alleen in bepaalde delen van de Verenigde Staten is waargenomen.

Wat de overbrenging van PV1 en PV2 in de practijk betreft, heeft men de betekenis van verschillende soorten van bladluizen leren kennen. Hoewel bladluizen in het algemeen niet in grote aantallen op boon worden gevonden (ZAUMEYER & KEARNS, 1936) – hetgeen een verklaring kan vinden in het voorkomen van haakvormige haren op de bonenbladeren, waar allerlei insecten op kunnen vastlopen, als gevolg waarvan zij sterven (DE FLUITER & ANKERSMIT, 1948; JOHNSON, 1953) – heeft men van verschillende soorten kunnen vaststellen, dat zij in staat zijn deze viren over te brengen. Zo worden vermeld voor PV1: *Macrosiphum solanifolii* Ashm. (NELSON, 1922), *Aphis rumicis* L. en *Myzus persicae* Sulz. (FAJARDO, 1930a), *Aphis gossypii* Glov., *Aphis medicaginis* Koch, *Illinoia pisi* Kltb., *Brevicoryne brassicae* L., *Myzocallis ononidis* Kltb., *Hyalopterus atriplicis* L., *Aphis spiraecola* Patch, *Rhopalosiphum pseudobrassicae* Davis, *Macrosiphum ambrosiae* Thos. (ZAUMEYER & KEARNS, 1936); voor PV2: *Macrosiphum solanifolii* Ashm. en *Illinoia pisi* Kltb. (PIERCE, 1934), *Myzus persicae* L. (GROGAN & WALKER, 1948b) en *Pergandeida craccae* L. (HEINZE, 1951)[1]). Hoewel in de literatuur geen precieze gegevens dienaangaande zijn te vinden, krijgt men uit de onderzoekingen, die met de genoemde vectoren zijn uitgevoerd, de indruk dat PV1 en PV2 tot de groep van de non-persistente viren behoren, hetgeen wil zeggen tot de viren, die in een korte zuigtijd door de vector uit de besmette plant kunnen worden opgenomen en in een korte zuigtijd aan een gezonde plant kunnen worden afgestaan (WATSON & ROBERTS, 1939).

GROGAN & WALKER (1948a) hebben tot een verwantschap tussen PV1 en PV2 besloten naar aanleiding van de resultaten van premuniteitsonderzoek. Op grond van de gegevens van verscheidene onderzoekingen met verschillende plantensoorten en viren uitgevoerd, kan worden aangenomen dat een plant, besmet met een virus, in het algemeen aldus beschermd is tegen infectie met een daarmee verwant virus. De restrictie „in het algemeen" wijst erop, dat er uitzonderingen op deze regel zijn. Toch wordt het al of niet voorhanden zijn van een beschermende werking van een virus ten opzichte van een ander als criterium voor verwantschap gebruikt (THUNG, 1949; BAWDEN, 1950). GROGAN & WALKER nu, toonden aan, dat PV1 de bonenplant tegen infectie met PV2 beschermt

[1]) Volgens mondelinge mededeling van de Heer D. HILLE RIS LAMBERS is een aantal van deze namen incorrect. De correcte namen zijn: *Macrosiphum solanifolii* Ashm. = *Macrosiphum euphorbiae* Thos.; *Aphis rumicis* L. = *Aphis fabae* Scop.; *Aphis medicaginis* Koch = *Aphis craccivora* Koch; *Illinoia pisi* Kltb. = *Acyrthosiphon pisum* Harris; *Myzocallis ononidis* Kltb. komt niet in Amerika voor, dit moet *Therioaphis trifolii* Monell zijn geweest; *Hyalopterus atriplicis* L. = *Hayhurstia atriplicis* L.; *Rhopalosiphum pseudobrassicae* Davis = *Lipaphis erysimi* Kltb.; *Macrosiphum ambrosiae* Thos. = *Dactynotus ambrosiae* Thos.; *Pergandeida craccae* L. = *Aphis craccae* L.

en dat PV2 de plant geheel of gedeeltelijk beschermt tegen PV1. FRANDSEN (1952) kon daarentegen geen wederzijdse premuniteit waarnemen. Dit kan een gevolg zijn van het gebruik van andere stammen van PV1 en PV2 dan de Amerikaanse auteurs toepasten. Dat in het geval van deze viren rekening met uitzonderingen op de premuniteitsregel moet worden gehouden blijkt uit het werk van FRANDSEN zelf, die vond dat twee stammen van PV1, die door hem dienaangaande werden beproefd, geen volledige wederzijdse premuniteit aan de bonenplant vermochten te geven.

Uit de resultaten van het onderzoek van BEEMSTER & VAN DER WANT (1951) zou kunnen worden geconcludeerd, dat PV1 en PV2 ook serologisch een relatie bezitten.

In dit hoofdstuk zullen de symptomen op enige waardplanten van enkele stammen, die van PV1 en PV2 werden geïsoleerd, worden beschreven, benevens de eigenschappen dezer stammen in vitro. Hierbij zal ook aan de zwartevaatziekte aandacht worden besteed. Voorts worden enige proeven over de overbrenging dezer viren door de bladluizen *Myzus persicae* en *Aphis fabae* genoemd. Ten slotte komen de ervaringen over het optreden en de verspreiding op het veld van PV1 en PV2 ter sprake.

2.2. Phaseolus-virus 1

2.2.1. *Symptomen en waardplantenreeks*

Het voorkomen van PV1 in Nederland werd reeds eerder gesignaleerd (HUYSKES, 1940; HUBBELING, 1942; VAN DER WANT, 1949). Naast de ook in buitenlandse publicaties beschreven mozaieksymptomen, die dikwijls met een misvorming van de bladeren (nl. versmalling en rolling van de bladschijf, door HUBBELING als „rolmozaiek" beschreven) gepaard gaat, is hier te lande melding gemaakt van een verschijnsel, dat met de naam steengrauw wordt betiteld. Hieronder verstaat men een meer of minder sterke omkrulling van de bladeren met de punt naar beneden. De nerven liggen dieper dan normaal en zijn vaak roodbruin tot donkerbruin verkleurd. Hiermede gaat doorgaans een verkleuring van het bladmoes naar lichtgroen tot geel of zelfs bruin gepaard. Deze kroezige bladeren voelen stug aan en zijn tegelijk veel brozer dan een gezond blad. Dit ziektebeeld is in de bovenaangehaalde publicaties van HUYSKES en HUBBELING niet als een verschijnsel van PV1 beschouwd.

Merkwaardig is, dat dit steengrauw alleen in het veld na een primaire besmetting bij bepaalde bonenrassen wordt waargenomen. Dit type van ziektebeeld blijft echter meestal beperkt tot de oudere bladeren; jonge scheuten, die tot ontwikkeling komen, geven rolmozaiek te zien. Secundair besmette planten (dat wil zeggen planten, opgroeiend uit besmet zaad) geven nimmer steengrauw te zien, doch vertonen direct mozaieksymptomen, veelal reeds op een der enkelvoudige bladeren of op beide. Wanneer men sap van steengrauw vertonende planten uitperst en dit sap onder gebruik van fijn carborundumpoeder in de kas uitwrijft op zeer jonge planten van een voor PV1 vatbaar ras, dan komen steeds op deze planten rolmozaieksymptomen tot ontwikkeling.

In de loop van het in deze paragraaf te beschrijven onderzoek kon worden aangetoond, dat steengrauw moet worden beschouwd als acuut symptoom in het ziekteproces bij bepaald bonenrassen na besmetting met PV1; het rolmozaiek kan als chronisch ziekteverschijnsel worden opgevat.

Aldus is het verklaarbaar, dat steengrauw nooit optreedt bij planten die via het zaad besmet werden, doch alleen bij primair geïnfecteerde planten.

Bij de bespreking van het begrip steengrauw moet worden opgemerkt, dat een hierop gelijkend ziektebeeld, dat hiervan in het veld moeilijk is te onderscheiden, door PV2 kan worden verwekt. Ook dan kan een krulling met verkleuring van het blad en necrose van de nerven optreden. De verschillen tussen steengrauw als gevolg van een aantasting door PV1 en de steengrauwachtige symptomen, die zich na besmetting met PV2 kunnen voordoen, zijn zo moeilijk van elkaar te onderscheiden, dat voor een herkenning in de practijk vaak gebruik wordt gemaakt van de ziekteverschijnselen op de jonge scheuten.

Van PV1 waren in dit onderzoek twee stammen voorhanden, nl. een die in 1948 uit een plant van het landbouwstambonenras Noordhollandse Bruine op het proefveld te Wageningen was geïsoleerd (deze stam wordt in het vervolg aangeduid als RM, hetgeen is afgeleid van de vroegere benaming: rolmozaiekvirus) en een stam, geïsoleerd uit een plant van het stokslabonenras Westlandia, welke in 1952 uit Naaldwijk werd ontvangen (deze stam wordt hierna met W aangeduid). Deze Westlandia-plant vertoonde op de oudere bladeren een fraaie, gele, aucuba-achtige mozaiektekening. Deze tekening was vrij grof en grillig, dit in tegenstelling tot het bij de ziekteverschijnselen van PV2 te noemen scherpmozaiek. De jonge volgroeide, alsmede de allerjongste nog niet ontplooide bladeren van de Westlandia-plant vertoonden daarentegen geen bijzonderheden. Na inoculatie van jonge Beka-bonenplanten met het sap uit de aucuba-achtige Westlandia-bladeren kwamen op de Beka-planten heftige symptomen van rolmozaiek tot ontwikkeling. Later werd deze virusstam op jonge planten van het ras Westlandia geïnoculeerd, maar in plaats van het aucuba-beeld kwamen duidelijk rolmozaiekverschijnselen te voorschijn. Op het veld kunnen geregeld aucuba-achtige symptomen bij bonen worden waargenomen. Deze symptomen zijn dan steeds tot de oudere bladeren beperkt. Een verklaring voor dit verschijnsel is nog niet gevonden.

De stammen RM en W werden de jaren door steeds met sap van plant op plant overgebracht en aldus in stand gehouden. Zij geven op de bonenrassen Beka en Dubbele Witte zonder draad symptomen, die gradueel van elkaar verschillen in die zin, dat de symptomen door stam W teweeggebracht geprononceerder zijn dan van stam RM (Fig. 1).

Met beide stammen werden verscheidene inoculaties met sap uitgevoerd. Het resultaat was, dat zij steeds de voor hen karakteristieke symptomen op de toetsplanten teweeg brachten.

Beide stammen bleken over te gaan op een deel van het zaad van de bonenplanten (rassen Beka en Dubbele Witte z.dr.), die er mee waren besmet. Na passage door het zaad bleken zij nog de voor elke stam karakteristieke symptomen teweeg te brengen.

De hierna te noemen ziekteverschijnselen hebben betrekking op die bij het ras Beka. Voor beide stammen geldt, dat de met sap geïnoculeerde bladeren pas symptomen gaan vertonen als de ziekteverschijnselen in de jonge delen der plant beginnen op te treden, d.w.z. ongeveer 10 tot 14 dagen na de inoculatie. Soms beginnen deze locale verschijnselen met zeer kleine chlorotische vlekjes, maar meestal blijven ze achterwege. Waarschijnlijk zijn het de uitwendige omstandigheden, die bepalen of deze vlekjes zichtbaar worden of niet. Wat wel algemeen als een symptoom op het geïnoculeerde blad optreedt is een chlorose van een deel

van het bladmoes langs de nerven, ten gevolge waarvan de nerven als een groen netwerk op die plaats afsteken. Deze „nesten" van zich tegen een lichtere achtergrond aftekenende nerven nemen in grootte toe; ten slotte is het gehele bladmoes chlorotisch. Langs de nerven begint dan een verbruining op te treden. Op den duur vergeelt of verbruint het gehele blad, doch doorgaans is het voordien al afgevallen (Fig. 2).

Het ziektebeeld, dat als verspreidingssymptoom optreedt, is afhankelijk van de leeftijd, waarin de proefplanten werden geïnoculeerd. Zijn de planten op het ogenblik van de inoculatie nog zeer jong (de enkelvoudige bladeren zijn zojuist ontplooid, maar nog niet uitgegroeid) dan treedt met de stam RM direct een onmiskenbaar rolmozaïeksymptoom op. De stam W kan in dit stadium een afsterving van de groeitop geven, doch de uitlopende knoppen van de enkelvoudige bladeren vertonen dan rolmozaiekverschijnselen (Fig. 2).

Zijn de planten iets ouder, d.w.z. zijn de enkelvoudige bladeren volgroeid, en is in de groeitop reeds een enigszins ontwikkeld drietallig blad te zien, dan gaat dit drietallige blad een meer of minder sterk steengrauwbeeld vertonen. Met stam RM wordt bij Beka doorgaans een vrij mild ziekteverschijnsel verkregen: de deelblaadjes van het drietallige blad krullen naar beneden om, de nerven liggen dieper dan normaal, maar necrose treedt niet op. Anders is dit bij stam W, die een zeer heftige krulling van het drietallige blad teweegbrengt, waarbij wel een nerfnecrose optreedt. Opmerkenswaard is, dat de steengrauwsymptomen bij Beka-planten, die in een warenhuis in grote potten werden geteeld veel geprononceerder waren en meer op het uit de practijk bekende steengrauw geleken dan bij planten, die in de kas (waar de temperatuur gelijkmatiger was) in kleine potten werden geteeld. De stam W veroorzaakt doorgaans ook bij oudere planten een afsterving van de uiterste top van de plant. Na verloop van tijd herstelt de plant zich als gevolg van het uitlopen van okselknoppen, en de nieuw gevormde bladeren vertonen rolmozaiek.

Bladeren, die op het ogenblik van inoculatie met de beide PV1-stammen reeds volgroeid zijn, vertonen nimmer enig ziekteverschijnsel. Dit komt algemeen voor bij virusziekten van het mozaiektype.

De hier geschetste invloed van de leeftijd van de plant op het ogenblik der inoculatie op de aard van de ziektesymptomen kon in twee series proeven duidelijk worden waargenomen. In de ene serie werden Beka-planten, die op 5 Augustus 1952 in potten in de kas waren gezaaid in series verdeeld en deze werden op achtereenvolgende data nl. op 22, 25 en 28 Augustus en op 1, 4, 8, 11 en 15 September met stam W geïnoculeerd. De op 22 Augustus geïnoculeerde planten vertoonden al spoedig een achterstand in groei, vele toppen werden necrotisch en de okselknoppen van de enkelvoudige bladeren gingen uitlopen. De necrose van het uiterste stengeltopje trad ook in de andere series na inoculatie met stam W op (Fig. 3). In de series, waarin de planten bij de inoculatie reeds bloemknoppen te zien gaven, verbruinden deze na enige tijd en vielen af. Hieruit blijkt, dat ook een latere aantasting met PV1 voor een ras als Beka funest kan zijn, daar veel bloemknoppen verdrogen en aldus de opbrengst aan peulen wordt gedrukt. Als gevolg van de afsterving der groeitoppen gaan de planten zich sterker vertakken. De vorming van zijspruiten naar aanleiding van de abortie der groeitoppen, werd niet meer waargenomen in de laatst geïnoculeerde planten. Waarschijnlijk waren deze reeds te ver gevorderd om nog nieuwe groei van zijspruitjes te beginnen.

Het is duidelijk, dat de bloeiperiode als gevolg van de abortie en het zich herstellen naar later wordt verschoven.

In de zomer van 1954 werd een soortgelijke proef genomen. De planten groeiden nu in een warenhuis in grote potten, die in de grond waren ingegraven. De Beka-bonen waren op 18 Mei gezaaid; er was nu een reeks van series die met stam W, een andere die met stam RM werden geïnoculeerd, hetgeen op 5, 12, 19 en 26 Juni geschiedde. Ook nu was het effect zoals boven beschreven: necrose van de uiterste toppen der planten en het optreden van steengrauw in de bladeren, die op het ogenblik der inoculatie aan het uitgroeien waren. Deze steengrauwsymptomen waren in de planten met stam RM geïnoculeerd minder hevig dan in die, waarbij stam W in het spel was.

Sommige van de peulen der planten, die met stam W waren besmet, vertoonden als typisch symptoom een licht groene verkleuring, die zich midden over de lengte van de peul uitstrekte (zgn. aalstreep, Fig. 4).

In dezelfde in 1952 en 1954 genomen proeven, waarvan zojuist sprake was, was ook het ras Dubbele Witte z.dr. betrokken. Bij dit ras kon in geen enkele serie het door Beka gedemonstreerde steengrauwbeeld worden waargenomen. Ook topnecrose kwam niet voor. Daarentegen kwam het rolmozaieksymptoom zeer opvallend tot ontwikkeling. Het viel op, dat er een abnormale uitgroei van verscheidene okselknoppen plaats had. De stimulering tot het uitlopen van deze knoppen behoeft blijkbaar niet samen te gaan met een afsterving van de groeitop van de hoofdstengel. Het is een verschijnsel, dat zich ook wel bij andere virusziekten voordoet.

Als gevolg van dit voortdurend opnieuw uitspruiten bij planten van het ras Dubbele Witte z.dr. wordt de gehele groeiperiode zeer lang uitgerekt. Dit kon in 1954 duidelijk op het proefveld te Wageningen worden waargenomen, waar in begin Mei gezaaide planten tot in September voortgingen met de vorming van nieuwe scheuten, die bloemknoppen opleverden. Deze planten waren sterk bossig van aard en er waren naast volgroeide peulen steeds bloemknoppen aanwezig. De peulen van deze planten waren doorgaans kort en krom. Deze ongunstige beïnvloeding van de kwaliteit van de peulen is ook door andere auteurs vermeld.

In het voorgaande werd over de symptomen bij de voor PV1 gewoon gevoelige rassen Beka en Dubbele Witte z.dr. gesproken. Het is nodig daar enige bijzonderheden over de zwartevaatziekte aan toe te voegen. Door WILTEN (1945) werd dit verschijnsel hier te lande het eerst bij bepaalde bonenrassen waargenomen. Aangetaste planten vertonen vergeling en een vaak eenzijdige donkerbruine tot zwarte verkleuring van stengel en bladstelen. De bladeren vergelen of verbruinen en gaan meestal verwelken, waarna zij afvallen (Fig. 5). Als een aangetaste plant peulen draagt, dan treedt hierin ook necrose op. Deze kan zich voordoen in de peulnaden, maar ook in het inwendige van de peulwand. Deze necrose doet zich dan door de epidermis heen als een donkerbruine vlekkigheid voor (Fig. 6). Vooral als de peul wordt doorgebroken is de donkerbruine tot zwarte verkleuring te zien. Deze ziekteverschijnselen zijn hier te lande nimmer waargenomen bij bonenrassen, die met symptomen van rolmozaiek, al dan niet gepaard gaande met steengrauw, op PV1 reageren. Daarentegen gaat het steeds om rassen, die als resistent tegen PV1 werden beschouwd, omdat zij nooit typische PV1-verschijnselen te zien gaven. Door het onderzoek van GROGAN & WALKER (1948c) is aangetoond, dat bij de zwarte vaatziekte toch PV1 in het spel is; dit kon hier

te lande reeds eerder worden bevestigd (VAN DER WANT, 1949). KLINKOWSKI & BEHR (1953) hebben evenals GROGAN & WALKER waargenomen, dat het verschijnsel slechts bij betrekkelijk hoge temperatuur (boven 20 °C) voorkomt. Bovendien namen de Duitse onderzoekers waar, dat de ziekte pas optreedt bij planten, die een zekere leeftijd hebben overschreden. Het ziet er naar uit, dat een plant pas zwartevaatziek kan worden als zij bloemknoppen heeft gevormd. Deze waarneming kon in het onderzoek, dat te Wageningen werd verricht, worden bevestigd. Nadere gegevens hierover zijn te vinden in 2.2.4. waar het voorkomen van het virus op het veld wordt besproken.

Tot nu toe is de zwartevaatziekte in Nederland alleen bekend bij een aantal tuinbouwrassen van *Phaseolus vulgaris* (HUBBELING, in druk). Tot de stamslabonenrassen, die aldus reageren, behoren Furore, Servus en Voorluk. Het was in waarnemingen gedurende enkele jaren opgevallen dat zich een verschil in aantastingspercentage bij deze drie rassen voordeed. Het ras Servus vertoonde namelijk steeds meer zieke planten dan de beide andere. Om dit nader te toetsen werd in 1953 een veldproef genomen. Een perceeltje van 8 × 10 m was in 16 vakjes van 2 × 2,5 m verdeeld. De rijen, waarin de bonen werden gezaaid, lagen in elk vakje 0,5 m uit elkaar, zodat per vakje 5 rijen van 2 m lengte voorkwamen. De afstand tussen de bonen in de rij was ongeveer 7 cm. Over het proefveld kwamen volgens het principe van het latijnse vierkant viermaal de rassen Dubbele Witte z.dr., Furore, Servus en Voorluk voor. Het ras Dubbele Witte z.dr. was toegevoegd om de verspreiding van PV1 te kunnen controleren, daar dit ras, zoals reeds gezegd, duidelijk met rolmozaiek reageert als het hiermee besmet wordt. De verspreiding van het virus had langs natuurlijke weg door middel van bladluizen plaats. Besmettingsbronnen in de vorm van secundair zieke bonenplanten waren in de naaste omgeving van het betreffende perceeltje in ruime mate voorhanden. Het bleek, dat enkele weken na opkomst (alle bonen waren begin Juni gezaaid) alle Dubbele Witte z.dr.-planten met PV1 besmet waren. Symptomen van zwartevaatziekte in de andere rassen werden pas in de loop van Augustus opgemerkt. De zwartevaatzieke planten werden eind Augustus geteld, evenals de totale aantallen planten. Gerekend naar het voorkomen van het aantal zwartevaatzieke planten per rij, was het optreden van deze ziekte over de vakjes met gevoelige rassen regelmatig verspreid. Ter wille van de ruimte zullen niet alle gegevens worden vermeld. De resultaten waren van dien aard, dat zonder wiskundige analyse duidelijk was, dat Servus aanmerkelijk meer zieke planten telde dan de andere rassen. Furore en Voorluk vertoonden gemiddeld 3,0 en 4,2 % zieke planten tegen 37,6 % bij Servus.

Nu moet in dit verband worden vermeld, dat Servus een veel kortere groeiperiode heeft dan Furore en Voorluk. Het ras is onder gelijke omstandigheden veel vroeger in bloei dan de twee andere rassen. De grotere gevoeligheid voor zwartevaatziekte, die in de vergelijkingsproef tot uiting kwam, zou wel eens met deze kortere groeiperiode samen kunnen hangen, temeer waar, zoals hierboven werd opgemerkt, de plant pas in staat is symptomen van zwartevaatziekte te ontwikkelen als zij een bepaald stadium in haar ontwikkeling heeft bereikt. Dit probleem heeft interessante physiologische aspecten, die nader onderzoek zeker waard zijn.

Nu in elk geval vastgesteld was, dat Servus zeer gevoelig is voor de zwartevaatziekte, werd dit ras in enige kasproeven voor inoculaties gebruikt. Er werd daarbij zowel gewerkt met jonge planten, die pas de enkelvoudige bladeren had-

den ontplooid, als met planten, die bloemknoppen hadden gevormd. In de loop van 1954 werden verscheidene proeven gedaan om te trachten door middel van inoculatie met sap van Beka-planten, besmet met PV1, stam RM dan wel stam W, onder gebruikmaking van fijn carborundumpoeder de zwartevaatziekte op te wekken. De temperatuur van de kas, waarin werd gewerkt was omstreeks 20°–23 °C. Geen der planten – in totaal waren in deze proeven 40 jonge en 40 oudere planten betrokken – vertoonde ziektesymptomen. Voorts werden proeven verricht, waarbij de proefplanten met een injectienaald werden geprikt in stengels en bladstelen. Ook hierbij werd geen resultaat geboekt. In een derde serie proeven, waarbij bladluizen (zowel *Aphis fabae* als *Myzus persicae*) werden gebruikt, was evenmin van succes sprake. In deze proefreeks kon iedere luis, die vooraf 1 tot 2 uur gevast had, gedurende korte tijd naar believen zuigen op een Beka-plant die met een der twee PV1-stammen besmet was, waarna zij een nacht over op een enkelvoudig blad van een Servus-plant werd gelocaliseerd. Op iedere plant zogen aldus twee luizen. In totaal waren in deze proeven 120 planten (60 oudere en 60 jonge) betrokken.

Het is niet mogelijk het negatieve resultaat van deze luizenproef te verklaren. Misschien was het aantal luizen, dat per plant werd gebruikt, te gering. In de practijk zijn de aantallen luizen, die in een seizoen een plant bezoeken zoveel groter en is er meer kans op besmetting.

De enige methode, die succes opleverde was die van de enting. GROGAN & WALKER (1948c) pasten de methode van de afzuigenting toe: de stengels van twee planten, respectievelijk van een met rolmozaiek en van een met zwartevaatziekte reagerend ras, werden verwond en met de wonden tegen elkaar gedrukt, waarna zij omwonden werden met raffia. De voor rolmozaiek gevoelige plant werd vervolgens met PV1 geïnoculeerd en na verloop van tijd kwamen zwartevaatziektesymptomen bij de andere plant te voorschijn.

In Wageningen zijn de proeven van GROGAN & WALKER in 1949 reeds herhaald met de rassen Furore en Voorluk, geënt met rolmozaiekzieke Beka. Ook hier kon aldus de zwartevaatziekte worden teweeggebracht. De planten, die voor deze proeven gebruikt werden, waren bijna in bloei; het manipuleren bij het enten gaat gemakkelijker met oudere planten. In 1954 werden entproeven verricht, waarbij in plaats van gehele rolmozaiekzieke Beka-planten kleine stukjes stengel van dergelijke planten op de stengels van gezonde Servus-planten werden geënt. Het ging om Beka-planten besmet met PV1 stam W, resp. stam RM. De Servus-stengels werden boven de enkelvoudige bladeren van een schuin naar boven gerichte snede voorzien, terwijl de opperhuid van het aldus ontstane lipje werd weggenomen. De stukjes stengel van de besmette Beka-planten kregen een snede, die in tegenovergestelde richting liep; ook hier werd de opperhuid op het lipje verwijderd. Een stengelstukje kon nu gemakkelijk in de snede op een Servus-plant worden ingeschoven, waarna het met elastisch band, dat de eigenschap heeft aan zichzelf vast te plakken, aan de stengel werd bevestigd. De gebruikte Servus-planten waren $1\frac{1}{2}$ maand oud en het stadium van bloei dicht genaderd. Zij werden nu in een ruimte geplaatst, die door fluorescentie-lampen werd verlicht (7 lampen vlak naast elkaar hangend op circa 70 cm boven de vloer, waarop de proefplanten stonden). De planten kregen van deze lampen van 7 uur tot 22 uur licht. De temperatuur schommelde als gevolg hiervan tussen 15 ° en 29 °C. Het resultaat van deze proef, die met 8 planten werd genomen, was, dat 5 planten 2 weken na de enting duidelijk symptomen van zwartevaatziekte gin-

gen vertonen, beginnende met een inwendige donkere verkleuring in de stengel uitgaande van de entingsplaats. De Servus-planten, die geënt waren met een stukje stengel van gezonde Beka-planten vertoonden de symptomen niet.

Het is niet bekend hoe de resultaten van een dergelijke proef zouden zijn geweest, indien de geënte Servus-planten in de kas zouden zijn geplaatst. Zolang men dit niet weet, is het niet geoorloofd de resultaten van deze proef te vergelijken met de negatieve resultaten van de proeven, waarin getracht werd met sap of bladluizen de zwartevaatziekte bij Servus op te wekken.

Enige laatste waarnemingen aangaande de zwartevaatziekte kunnen hier nog worden vermeld. In Augustus 1954 werd op het proefterrein bij het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek te Wageningen een aantal peulen van Servus verzameld; enige vertoonden duidelijke verschijnselen van zwartevaatziekte, de overige zagen er volkomen normaal uit. Van beide werd sap gewonnen, dat op jonge Beka-planten geïnoculeerd werd. De planten, ingewreven met het sap van zieke peulen, vertoonden na enige weken duidelijke PV1-symptomen, de andere bleven gezond. Hieruit blijkt, dat in zwartevaatzieke peulen, PV1 in dergelijke concentratie aanwezig kan zijn, dat het gemakkelijk op normaal gevoelige rassen kan worden overgebracht. Een gezond uiterlijk van de peulen van Servus is echter geen waarborg voor de afwezigheid van het virus. Van 18 volkomen normale Servus-peulen, in September geplukt op het veld en daarna overgebracht in petrischalen met vochtig filtreerpapier, geplaatst in een ruimte bij 20 °C onder continuë belichting van fluorescentie-lampen, gingen er nl. 8 binnen twee weken typische zwartevaatziektesymptomen ontwikkelen.

Aangaande de waardplantenreeks van PV1 kan worden opgemerkt, dat het slechts gelukte *Phaseolus vulgaris* te besmetten. Geen enkele der volgende plantensoorten ging na inoculatie symptomen vertonen of gaf aanleiding te veronderstellen, dat het virus er desondanks in aanwezig was: White Burley tabak, *Gomphrena globosa*, komkommer, witte-, rode-, bastaard- en incarnaatklaver, lucerne, tuinboon (ras Driemaal wit) en erwten (ras Unica). Met lucerne werd een uitvoeriger proef gedaan, waarin getracht werd de stam W en de stam RM op deze soort over te brengen door middel van *Myzus persicae*. Het bleek echter niet mogelijk later, met behulp van inoculatie met sap dezer lucerne-planten op Beka-bonen, PV1 in een van de lucerne-planten aan te tonen.

2.2.2. *Eigenschappen van Phaseolus-virus 1 in vitro*

Hierbij ging het om de bepaling van de inactiveringstemperatuur, de verdunningsgrens en de houdbaarheid in sap van de 2 virusstammen.

De volgende proefjes werden uitgevoerd met sap van Beka-planten, die drie weken eerder waren geïnoculeerd met PV1 stam W, resp. stam RM. In één reeks werd dit sap in porties van 1 ml gedurende 10 min. in waterbad bij resp. 50 °, 55°, 60°, 65° en 70 °C verhit. Na de verhitting werden de monsters snel in stromend kraanwater gekoeld en vervolgens onder gebruikmaking van fijn carborundumpoeder op jonge Beka-planten geïnoculeerd. Een andere reeks werd gevormd door sap, dat met gedestilleerd water verdund was tot resp. 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} en 10^{-4}. Ten slotte was er een serie, waarbij van sap, dat bij kamertemperatuur werd bewaard na 24, 48 en 72 uur monsters werden genomen, waarvan steeds een verdunningsreeks, zoals juist genoemd, werd gemaakt. Elk lid van iedere reeks werd op 4 Beka-planten uitgewreven; in iedere reeks werden vier planten

als contrôle met het onbehandelde, verse perssap geïnoculeerd. De resultaten van de proefreeksen zijn in Tabel I samengevat.

TABEL I. Besmettelijkheid van sap van Beka-planten, respectievelijk besmet met *Phaseolus-virus 1* stam W en stam RM na verschillende behandeling

TABLE I. *Infectivity of sap from Beka bean plants infected with Phaseolus virus 1 strain W and strain RM, respectively, after various treatments*

Sap verhit tot *Sap heated to*	W	RM	Concentratie van sap *Concentration of sap*	Sap bewaard gedurende *Sap stored for*							
				0 h		24 h		48 h		72 h	
				W	RM	W	RM	W	RM	W	RM
50°C	4/4[1])	4/4	onverdund *undiluted*	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	1/4
55°C	0/4	0/4	10^{-1}	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	1/4
60°C	0/4	0/4	10^{-2}	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4
65°C	0/4	0/4	10^{-3}	3/4	3/4	3/4	2/4	1/4	1/4	0/4	0/4
70°C	0/4	0/4	10^{-4}	1/4	3/4	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4

[1]) Aantal planten met symptomen/aantal geïnoculeerde planten
Number of plants showing symptoms/number of plants inoculated

Hieruit volgt voor beide viren een inactiveringstemperatuur tussen 50° en 55 °C; de verdunningsgrens is in vers sap bij een verdunning van 10^{-4} nog niet bereikt. Na 72 uur bewaren bij kamertemperatuur is de activiteit van stam W verdwenen; stam RM is dan nog in geringe concentratie voorhanden. De inactivering is echter na 48 uur al merkbaar voortgeschreden.

De hier gevonden waarden verschillen betrekkelijk weinig van de in de literatuur vermelde (FAJARDO, 1930b; PIERCE, 1934; FRANDSEN, 1952).

2.2.3. *Overbrenging van Phaseolus-virus 1 door Myzus persicae Sulz. en Aphis fabae Scop.*

In Juni 1951 werd een eenvoudig opgezette proef genomen om na te gaan of *M. persicae* in staat is PV1 in korte zuigtijd uit een besmette plant op te nemen en in dito zuigtijd aan een gezonde plant af te staan. Besmettingsbron was een Beka-plant, die 17 dagen tevoren met PV1 stam RM was geïnoculeerd. *M. persicae*, die minstens 4½ uur had gehongerd kreeg gelegenheid maximaal 15 sec. op deze besmettingsbron te zuigen. Zij werd daarna met een penseel overgebracht op een enkelvoudig blad van een jonge Beka-plant, waarop zij maximaal 10 sec. kon zuigen; vervolgens werd zij op een enkelvoudig blad van een tweede Beka-plant overgebracht, waar zij weer een korte periode van maximaal 10 sec. kon zuigen, enz. tot zij 5 planten gepasseerd was, waarna zij werd gedood. Vijf exemplaren van *M. persicae* passeerden aldus een reeks van 5 proefplanten. In totaal waren er 5 reeksen van 5 proefplanten, waarin dus 25 bladluizen betrokken waren.

Het resultaat van deze proef is weergegeven in Tabel II (blz. 12).

In Juli 1951 werd een volkomen gelijke proef met *A. fabae* genomen; deze had vooraf 5 uur gehongerd. De besmettingsbron was toen een maand oud. De resultaten van deze proef zijn in Tabel III, blz. 12, vastgelegd.

Tabel II. Overbrenging van *Phaseolus-virus 1* stam RM door middel van *Myzus persicae* die minstens 4½ uur heeft gehongerd. Iedere reeks bestaat uit 5 proefplanten, die na elkaar door 5 luizen zijn bezocht. Maximum zuigtijd op de besmettingsbron 15 sec., op de toetsplanten 10 sec.

Table II. *Transmission of Phaseolus virus 1 strain RM by Myzus persicae which were fasted for 4½ hours. Every series contains 5 test plants which were visited in succession by 5 aphids. Maximum infection feeding 15 sec.; maximum test feeding 10 sec.*

Plant / reeks *series*	1	2	3	4	5
1	–[1]	+	–	–	–
2	+	–	+	+	–
3	–	+	–	–	–
4	+	–	+	+	+
5	+	+	–	+	+

[1]) + = toetsplant besmet; – = toetsplant niet besmet
+ = *test plant infected; – = test plant not infected*

Tabel III. Overbrenging van *Phaseolus-virus 1* stam RM door middel van *Aphis fabae* die minstens 4½ uur heeft gehongerd. Iedere reeks bestaat uit 5 proefplanten, die na elkaar door 5 luizen zijn bezocht. Maximum zuigtijd op de besmettingsbron 15 sec., op de toetsplanten 10 sec.

Table III. *Transmission of Phaseolus virus 1 strain RM by Aphis fabae which were fasted for 4½ hours. Every series contains 5 test plants which were visited in succession by 5 aphids. Maximum infection feeding 15 sec.; maximum test feeding 10 sec.*

plant / reeks *series*	1	2	3	4	5
1	+[1]	+	–	–	+
2	–	–	–	–	–
3	+	+	+	+	–
4	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–

[1]) + = toetsplant besmet; – = toetsplant niet besmet
+ = *test plant infected; – = test plant not infected*

Uit de gegevens van de Tabellen II en III kan worden geconcludeerd, dat zowel *M. persicae* als *A. fabae* in staat is PV1 in zeer korte zuigtijd op te nemen en in zeer korte zuigtijd af te staan. Uit het feit, dat *M. persicae* planten in alle vijf reeksen heeft besmet, doch *A. fabae* maar in 2 van de 5 reeksen, zou kunnen worden afgeleid, dat *M. persicae* beter in staat is PV1 over te brengen dan *A. fabae*.

In Hoofdstuk 4 zijn de resultaten van uitgebreidere proeven over de over-

brenging door de genoemde luizensoorten bijeengebracht, zodat voor verdere bijzonderheden daar naar moge worden verwezen.

2.2.4. *Het optreden en de verspreiding van Phaseolus-virus 1 in het veld*

Enige jaren achtereen werden op het proefterrein te Wageningen zaaitijdenproeven met bonen genomen ten einde een indruk te krijgen over de besmetting met PV1 op verschillende tijdstippen in het seizoen.

In deze proeven werd iedere week van begin Mei tot begin September een vakje van 2 × 2 m met het ras Dubbele Witte z.dr. bezaaid. Deze vakjes lagen langs een strook van 2 rijen Noordhollandse Bruine boon, waarin een behoorlijk aantal secundair rolmozaiekzieke planten voorkwam. In deze proeven viel het steeds op, dat er reeds vroeg in het seizoen een belangrijke verbreiding van PV1 plaats greep, gezien het spoedig ziek worden van de eerst gezaaide bonen. Deze verspreiding ging het gehele seizoen door, om pas in Augustus minder te worden. De na half Augustus gezaaide bonen werden niet zo snel meer besmet en er bleven, althans op het oog, gezonde planten tussen staan.

In 1954 werd uitvoeriger dan tevoren in een zaaitijdenproef het optreden van de ziektesymptomen bijgehouden. De zaaitijdenproef omvatte nu, naast het ras Dubbele Witte z.dr., het ras Servus, teneinde gegevens te verkrijgen over het optreden van de zwartevaatziekte in de loop van het seizoen. Met betrekking hiertoe was het een gelukkige omstandigheid, dat toevallig in de naaste omgeving van deze zaaitijdenproef temperatuurmetingen werden verricht.[1])

Ook werden, volgens het principe van MOERICKE (1951), met behulp van een gele vangbak gegevens verzameld over de vlucht van bladluizen boven het terrein, waar zich de zaaitijdenproef bevond.[2]) Het model van de bak was zoals door HILLE RIS LAMBERS (1953) gebruikt. De bodem mat binnenwerks 49 × 31,5 cm; de onder een hoek van 60° opstaande randen waren 8 cm hoog. De kleur van binnenkant van bodem en van het onderste deel van de rand was Hansageel. De bak, die zich ongeveer 50 cm boven de grond bevond, was gevuld met een verdunde nicotine-oplossing. Op onbepaalde tijden werden de in de bak gevangen insecten verzameld door de vloeistof uit een in de bodem aanwezige afvoeropening van 2 cm diameter weg te laten lopen en door kaasdoek te filtreren. De totale aantallen luizen werden geteld, alsmede de exemplaren van *Myzus persicae* en *Aphis fabae*, die zich hieronder bevonden. De gegevens, die over deze twee soorten werden verkregen, zijn tot Fig. 7 verwerkt. De vangsten werden, zoals gezegd, op onbepaalde tijden geteld. Slechts enkele malen werden de luizen, die over een dag gevangen waren, verzameld. Meestal gingen er meer dagen (tot een week toe) over heen voordat de bak opnieuw werd geledigd. De in Fig. 7 weergegeven aantallen zijn gemiddelden, die als volgt werden berekend. De vangsten van de luizen in een week werden gesommeerd en door 7 gedeeld. De betreffende weken werden nu zo gekozen, dat de in de figuur aangegeven data er midden in vielen. Deze data correspondeerden met de opkomst van de bonen in de zaaitijdenproef. Omstreeks 13 Juli heeft het zo hard geregend, dat de vangbak overliep. Als gevolg daarvan ontbreken de gegevens over de luizenvlucht.

De laatste decade van Mei en de eerste twee decaden van Juni, toen *M. persi-*

[1]) Schrijver is Ir A. M. VAN DOORN zeer erkentelijk voor het ter beschikking stellen van de gegevens, die in de zomer van 1954 met behulp van een thermograaf werden verzameld.

[2]) De Heer W. VAN SOEST heeft de gevangen luizen verzameld en geteld. Voor de door hem verstrekte gegevens wordt hier gaarne hartelijke dank betuigd.

cae en *A. fabae* nog niet of nauwelijks werden gevangen, kwamen zeer grote aantallen luizen van de soort *Phyllaphis fagi* L.[1]) voor. Dit beïnvloedde het verloop van het totaal aantal gevangen bladluizen zodanig, dat dit niet parallel was aan het verloop van de aantallen *M. persicae* en *A. fabae*. Later in het seizoen hielden deze wel gelijke tred met de totale luizenvangsten.

De zaaitijdenproef was in 1954 zo ingericht, dat van 7 Mei af tot eind Augustus toe, iedere week een vakje van 4 rijen van 2 m lengte met Dubbele Witte z.dr. werd gezaaid en een dito veldje met Servus; per vakje bevonden zich 65 tot 80 planten. Deze twee rassen lagen dus om en om in een lange strook. Langs deze strook lagen als besmettingsbron twee rijen Noordhollandse Bruine boon. Alle rijen bonen lagen in de lengterichting van de lange strook proefveld. Bij een desbetreffende telling bleek ongeveer 25 % van de planten in de rijen Noordhollandse Bruine secundair met PV1 te zijn besmet. De besmettingsbron was niet in een keer gezaaid. Op 7 Mei was een strook hiermee bezaaid, van een dusdanige lengte, dat alle veldjes, die in Mei met Dubbele Witte z.dr. en Servus bezaaid zouden worden er langs konden worden geplaatst. Begin Juni werd de besmettingsstrook verlengd voor de vakjes in die maand te zaaien, enz. Dit diende om de leeftijd van de besmettingsbron steeds zoveel mogelijk in overeenstemming met de leeftijd van de planten op de proefvakjes te doen zijn.

Geregeld werden waarnemingen over het optreden van symptomen als gevolg van aantasting door PV1 verricht. Zoals reeds vermeld werd, reageert Dubbele Witte z.dr. op PV1 met verschijnselen van rolmozaiek, terwijl Servus het zwartevaatziektebeeld te zien geeft.

Tabel IV. Rolmozaiek-zieke planten van het ras Dubbele Witte z. dr. in een zaaitijdenproef te Wageningen in 1954

Table IV. *French bean plants (variety Dubbele Witte z. dr.) showing common mosaic in a field experiment at Wageningen in 1954*

Bonen gezaaid *Beans sown*	Opkomst omstreeks *Beans emerged about*	Waarnemingen op *Observations on*												
		17 Juni	24 Juni	1 Juli	9 Juli	20 Juli	27 Juli	4 Aug.	11 Aug.	18 Aug.	27 Aug.	2 Sept.	11 Sept.	27 Sept.
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
7 Mei	18 Mei	11*)	44	100	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14 Mei	25 Mei	0	19	76	100	–	–	–	–	–	–	–	–	–
21 Mei	31 Mei	0	6	86	100	–	–	–	–	–	–	–	–	–
28 Mei	8 Juni	–	0	77	100	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4 Juni	17 Juni	–	0	75	91	100	–	–	–	–	–	–	–	–
11 Juni	22 Juni	–	–	0	77	100	–	–	–	–	–	–	–	–
18 Juni	29 Juni	–	–	–	0	100	–	–	–	–	–	–	–	–
25 Juni	6 Juli	–	–	–	–	0	100	–	–	–	–	–	–	–
2 Juli	13 Juli	–	–	–	–	–	0	100	–	–	–	–	–	–
9 Juli	20 Juli	–	–	–	–	–	–	0	75	100	–	–	–	–
16 Juli	25 Juli	–	–	–	–	–	–	–	82	95	100	–	–	–
23 Juli	2 Aug.	–	–	–	–	–	–	–	0	53	88	96	100	–
30 Juli	11 Aug.	–	–	–	–	–	–	–	0	0	21	48	94	100
6 Aug.	18 Aug.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0	19	82
13 Aug.	25 Aug.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	22	69

*) 100% = alle planten zijn aangetast
100% = *all plants are diseased*

[1]) Volgens de Heer D. Hille Ris Lambers.

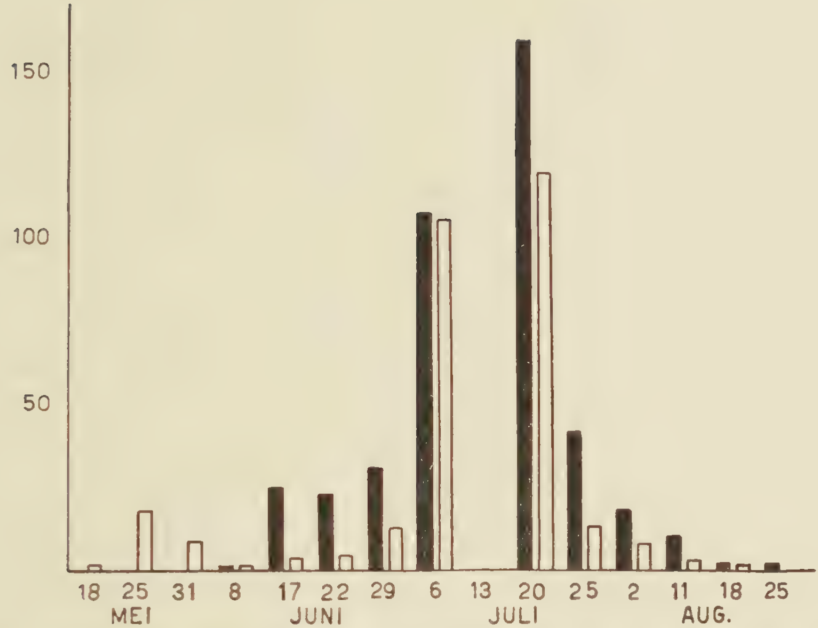


Fig. 7. Aantallen gevleugelde bladluizen (*Myzus persicae*, zwart, en *Aphis fabae*, wit) gevangen met een gele vangbak op het proefterrein te Wageningen, gedurende de zomer van 1954. De gegevens zijn gemiddelde dagelijkse vangsten berekend uit de totale vangsten van een week. Omstreeks 13 Juli konden geen gegevens worden verzameld wegens het overstromen van de vangbak ten gevolge van de vele regen.

Numbers of winged aphids (Myzus persicae, black, and Aphis fabae, white) caught in a yellow trap during the summer of 1954 at the Wageningen experimental field. The data are mean daily figures grouped by weekly periods. In the period around July 13th no data on aphid flight could be collected as the trap was flooded by excessive rainfall.

In Tabel IV zijn de gegevens betreffende Dubbele Witte z.dr. samengevat. Er is duidelijk een verloop in de snelheid van virusoverdracht te bespeuren. De op 18 Juni, 25 Juni en 2 Juli gezaaide bonen, die dus opgekomen zijn omstreeks 29 Juni, 6 Juli en 13 Juli, blijken resp. op 20 Juli, 27 Juli en 4 Augustus alle besmet te zijn. Het is duidelijk, dat dit correleert met de enorme top in de luizenvangsten (zie Fig. 7). Wanneer de aantallen luizen, die gevangen worden, in de tweede helft van Augustus afnemen, wordt de tijdsduur, nodig voor de besmetting van alle planten in een proefvakje weer groter, zoals ook bij de eerst gezaaide bonen. Het is jammer, dat de afneming van de aantallen vliegende bladluizen niet eerder is ingezet. Wellicht was dan het effect hiervan op de besmetting met PV1 in de later gezaaide bonen nog duidelijker geweest.

Gezien het verloop van de aantallen gevleugelde bladluizen en in aanmerking nemende, dat de incubatietijd onder de gegeven omstandigheden bij een ras als Dubbele Witte z.dr. ongeveer 14 dagen bedraagt, moet worden aangenomen dat de overbrenging van PV1, op de op 7 Mei gezaaide bonen, door *Aphis fabae* is begonnen. In de tweede helft van Juni, toen *Myzus persicae* in grotere aantallen verscheen, nam evenwel de verspreiding van het virus toe, zoals uit Tabel IV blijkt. Begin Juli, bij stijging van de aantallen gevleugelden van beide luizen-

soorten, is ook het aandeel van *A. fabae* weer groter geworden. Andere soorten zullen dan wellicht ook een bijdrage tot de verspreiding van het virus hebben geleverd.

De gegevens, die over het ras Servus in de zaaitijdenproef werden verzameld, zijn bijeengebracht in Tabel V. Naar hieruit blijkt, werden de eerste symptomen

TABLE V. Zwartevaatzieke Servus-planten in een zaaitijdenproef te Wageningen in 1954

TABLE V. *„Black root" (PV 1) in Servus beans sown on different dates in a field experiment at Wageningen in 1954*

Bonen gezaaid *Beans sown*	Opkomst omstreeks *Beans emerged about*	Begin van bloei omstreeks *Flowering began about*	Waarnemingen op *Observations on*						
			4 Aug.	11 Aug.	18 Aug.	27 Aug.	2 Sept.	11 Sept.	27 Sept.
7 Mei	18 Mei	28 Juni	+ [1]	100% [2]	–	–	–	–	–
14 Mei	25 Mei	5 Juli	+	100%	–	–	–	–	–
21 Mei	31 Mei	11 Juli	+	100%	–	–	–	–	–
28 Mei	8 Juni	17 Juli	+	52%	100%	–	–	–	–
4 Juni	17 Juni	24 Juli	0	5%	19%	78%	100%	–	–
11 Juni	22 Juni	30 Juli	0	6%	15%	15%	49%	100%	–
18 Juni	29 Juni	6 Aug.	0	3%	5%	11%	17%	85%	88%
25 Juni	6 Juli	13 Aug.	–	–	–	0	4%	9%	9%
2 Juli	13 Juli	19 Aug.	–	–	–	–	–	0	+
9 Juli	20 Juli	26 Aug.	–	–	–	–	–	–	–
16 Juli	25 Juli	2 Sept.	–	–	–	–	–	–	–
23 Juli	2 Aug.	11 Sept.	–	–	–	–	–	–	–
30 Juli	11 Aug.	19 Sept.	–	–	–	–	–	–	–
6 Aug.	18 Aug.	27 Sept.	–	–	–	–	–	–	–
13 Aug.	25 Aug.	–	–	–	–	–	–	–	–

[1]) + = er worden alleen necrotische nerven waargenomen
+ = *only necrosis of veins was observed*

[2]) 100% = alle planten zijn aangetast
100% = *all plants are diseased*

van de zwartevaatziekte op 4 Augustus waargenomen in de bonen, die op 7 t/m 28 Mei waren gezaaid. Het betrof het voorkomen van necrotische nerven in „nesten", zoals weergegeven in Fig. 8. Dit verschijnsel wordt doorgaans in samenhang met zwartevaatziekte bij Servus waargenomen. Waarschijnlijk is het een reactie op PV1 op de plaats waar het virus door de bladluizen in het blad is gebracht. Merkwaardig is, dat op 11 Augustus de planten in de vakjes, die op 7, 14 en 21 Mei waren gezaaid duidelijk verschijnselen van zwartevaatziekte vertoonden. Er traden nu voornamelijk symptomen op de peulen op, maar ook hadden vele planten de kenmerkende eenzijdige necrose in de stengel. Later verwelkten vele bladeren en na 11 Augustus verdroogde het gewas in deze vakjes geheel, ondanks de regen, die nog rijkelijk gevallen is. In de op 28 Mei en 4, 11 en 18 Juni gezaaide Servus bleek het optreden van de zwartevaatziekte over deze vakjes langzamer te geschieden dan in de drie vakjes aan het begin van de reeks en wel langzamer naarmate de zaaitijd later viel. Ten slotte werden onder de op 2 Juli gezaaide planten pas op 27 September enige gevonden, die necrotische nerven in nesten vertoonden. De later gezaaide Servus-bonen waren op 27 September nog vrij van zwartevaatziekte.

Beschouwt men het temperatuurverloop van eind Mei tot eind September, zoals weergegeven in Fig. 9, dan blijkt dit vrij gelijkmatig te zijn, al hadden

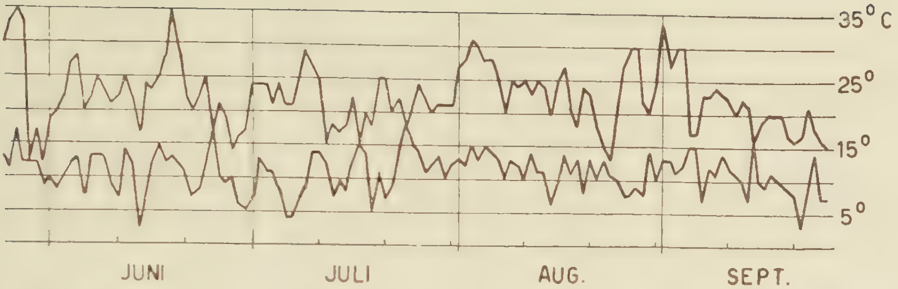


Fig. 9. Maximum- en minimum temperaturen op 10 cm boven het maaiveld op het proefveld te Wageningen gedurende de periode van 25 Mei tot 25 September 1954.
Maximum and minimum temperatures 10 *cm above ground at the Wageningen experimental field from May 25th to September 25th,* 1954.

enige dagen een lage minimumtemperatuur. Veel aanknopingspunten zijn er met het optreden van de zwartevaatziekte niet. Het enige, dat betekenis kan hebben is, dat in de periode van 24 Juli tot 13 Augustus de minimumtemperatuur niet beneden 10 °C daalde en de maximum temperatuur steeds 20 °C of hoger was. Op 4 Augustus werden immers de eerste necrotische nerven waargenomen, terwijl op 11 Augustus in de tot 4 Juni gezaaide bonen veel zwartevaatzieke planten werden gevonden.

Duidelijk blijkt, dat de leeftijd van de Servus-plant van grote betekenis is voor het optreden van symptomen der zwartevaatziekte. Zo was de op 25 Juni gezaaide Dubbele Witte z.dr. reeds op 27 Juli voor 100 % door PV1 aangetast. Men moet dus aannemen, dat deze planten vrij spoedig na het opkomen op 6 Juli door bladluizen, die dit virus droegen, zijn bezocht. Hetzelfde bezoek zal, zonder twijfel, de Servus-planten, die ook op 25 Juni waren gezaaid, ten deel zijn gevallen. Desondanks was op 27 September slechts 9 % van deze planten zwartevaatziek, terwijl de op 7, 14 en 21 Mei gezaaide Servus-bonen alle op 4 Augustus waren aangetast.

Een belangrijke vraag is nog, wat er met het virus gebeurt als het door de luizen is ingebracht in Servus-planten, die te jong zijn om zwartevaatziek te worden. Het is niet onmogelijk, dat het virus zich door de plant verspreidt zonder evenwel symptomen te verwekken. De incubatietijd zou dan oneindig zijn. Een aanwijzing voor deze opvatting is gelegen in de ervaringen, dat een volkomen gezond uitziende Servus-peul, bij hogere temperatuur bewaard, symptomen van zwartevaatziekte kan gaan vertonen (zie blz. 10), met andere woorden, de incubatietijd wordt aldus tot een einde gebracht.

2.3. Phaseolus-virus 2

2.3.1. *Symptomen en waardplantenreeks*

Door HUBBELING (1942) werd vermoed, dat PV2 ook in Nederland voor zou komen. Hij grondde dit niet op de resultaten van infectieproeven, maar op in het veld verrichte waarnemingen. Later (VAN DER WANT, 1949) kon worden aangetoond, dat een hevige vorm van afsterving bij bonen, die eens werd waargenomen, aan besmetting door een stam van PV2 moest worden toegeschreven. Dit werd geconcludeerd uit de resultaten van een aantal inoculatieproeven.

Het vraagstuk over het voorkomen van dit virus werd omstreeks de tijd dat

2

het laatstgenoemde artikel werd gepubliceerd actueel. Dit bleek nl. een gevolg te zijn van de opleving van de gladiolenteelt in West-Friesland na de tweede wereldoorlog. In dit gebied met zijn vele zaadteeltbedrijven heeft ook de verbouw van allerlei rassen van stamsla- en stokbonen voor de winning van zaad betekenis. Meestal worden verschillende gewassen door dezelfde tuinder geteeld en zo ook komen gladiolen en bonen op hetzelfde bedrijf veel voor. In een aantal gevallen, dat gladiolen en bonen naast elkaar werden verbouwd traden nu hevige afstervingsverschijnselen in de bonen op (HOUTMAN, 1949). Het bleek, dat men soortgelijke ziektesymptomen bij bonen reeds ver voor de tweede wereldoorlog in Noord-Holland kende; HUS (persoonlijke mededeling) herinnerde zich deze ziekte reeds omstreeks 1925 te hebben opgemerkt.

Deze ervaringen werden in verband gebracht met het door MCWHORTER, BOYLE & DANA (1947) geconstateerde feit, dat gladiolen besmet kunnen zijn met PV2. In 1949 werden dienaangaande enige veldproeven genomen, waarmee inderdaad kon worden aangetoond, dat ook in ons land PV2 in het spel was. Deze veldproeven zullen in 2.2.4. ter sprake komen.

Zeer veel keren werd PV2 met sap uit gladiolen (ras Nieuw-Europa) geïsoleerd. Merkwaardig is, dat de gladiolen, die aldus virus bleken te bevatten, geen duidelijke symptomen op de bladeren te zien gaven. Dit staat in tegenstelling tot de mededeling van anderen (BRIDGMON & WALKER, 1952; BERKELEY, 1953), die als symptoom een zwak mozaiek opgeven en dikwijls een breking van de bloemkleur. Deze breking werd ook wel waargenomen, maar het is bij het onderzoek te Wageningen niet duidelijk gebleken, dat zij steeds gepaard ging met aanwezigheid van PV2.

De meeste proeven aangaande PV2 werden met twee verschillende isolaties uitgevoerd. Gezien de verschillen in symptomen, die door deze isolaties bij enige bonenrassen werden verwekt, kan worden aangenomen, dat het verschillende stammen van PV2 waren.

De ene stam was reeds in 1947 geïsoleerd uit een afstervende bonenplant, die op een tuindersbedrijf in de omgeving van Rotterdam was gevonden. Gezien het feit, dat deze stam bij enkele bonenrassen, onder welke Dubbele Witte z.dr. een hevige topnecrose veroorzaakt, wordt deze stam hier met de letters TN aangeduid. De andere stam was afkomstig uit een gladiool van het ras Nieuw-Europa en geeft op dezelfde rassen, die met stam TN afsterven, een mozaiekbeeld. Deze stam wordt verder stam D genoemd naar aanleiding van een gelijkluidende aanduiding van de gladiolenplant, waaruit deze stam werd geïsoleerd.

Worden jonge Beka-planten met PV2 stam TN geïnoculeerd, dan vertonen de ingewreven bladeren binnen een week epinastie, terwijl na een dag of tien de top een krulling in de vorm van een bisschopsstaf gaat vertonen. Deze top wordt hierbij necrotisch. Het kan enkele weken duren voor de plant geheel is afgestorven. Op de geïnoculeerde bladeren komt nog chlorose van de nerven, plaatselijk vergezeld gaande van nerfnecrose, tot ontwikkeling. Op den duur vergelen deze bladeren geheel. Vaak sterft Beka niet geheel af, maar gaat traag spruiten ontwikkelen uit de okselknoppen der enkelvoudige bladeren. De bladeren, die hieraan ontstaan, zijn mozaiekachtig geschakeerd en meestal misvormd, echter niet in de zin, dat zij sterk krullen of rollen. Soms levert een dergelijke plant nog enkele peulen; deze zijn dan dikwijls mozaiekachtig gevlekt.

Treedt dit geschetste herstel bij Beka, besmet met PV2 stam TN, onder vorming van mozaiek-vertonende bladeren aan zijscheuten vrij veelvuldig op, het

ras Dubbele Witte z.dr. gaat in verreweg de meeste gevallen direct te gronde. Anders is het met het ras Servus gesteld, wanneer dit met PV2 stam TN besmet raakt. Het eerste drietallige blad, dat zich na de inoculatie ontplooit, gaat enigszins „knijpen", dat wil zeggen de punten der deelblaadjes buigen licht naar beneden om. Bij verdere uitgroei van dit blad blijft deze stand min of meer behouden. Het blad geeft eerst een oplichting van de nerven (zgn. „vein clearing") te zien, maar later treedt een mozaiekachtige bontheid op. Deze bontheid is echter veel duidelijker te zien op de volgende drietallige bladeren. In tegenstelling tot het mozaiek, dat als gevolg van een aantasting door PV1 bij daarvoor gevoelige rassen optreedt, is dat wat hier in het spel is veel fijner en bovendien geprononceerder. De lichter groene bladgedeelten zijn meer geel van tint met als gevolg, dat de donkerder partijen scherper afsteken. Dit inspireerde HUBBELING tot de naam scherpmozaiek.

Beschouwen we thans de symptomen, die bij deze drie bonenrassen door PV2 stam D teweeg worden gebracht. Op het ras Beka geeft deze stam geen topnecrose, echter wel een groeiremming. Het drietallige blad, dat na de inoculatie tot ontplooiing komt, vertoont het knijpen, zoals zojuist beschreven voor Servus die besmet is met stam TN, nog duidelijker. Hierbij kan het blad zelfs sterk kroezig worden en er dan nagenoeg eender uitzien als in het geval van steengrauw ten gevolge van PV1, maar dan zonder necrose van de nerven. Later ontwikkelt zich op deze Beka-planten een duidelijk scherpmozaiek (Fig. 10). Het verloop bij het ras Dubbele Witte z.dr. is ongeveer gelijk aan dat bij Beka. De bladeren, die scherpmozaiek vertonen, kunnen nu evenwel vrij sterk misvormd zijn. Servus, ten slotte, geeft met PV2 stam D veel minder duidelijk scherpmozaiek dan met stam TN; dikwijls blijft het slechts bij een soort van „vein clearing" in de jongere bladeren, die bij voortschrijdende groei van het blad vervaagt. Merkwaardig zijn bij Servus de verschijnselen, die dikwijls op het met PV2 stam TN of stam D geïnoculeerde blad zichtbaar worden. Na ongeveer 10 dagen komen dan chlorotische vlekjes voor, die samenhangen met een chlorose van de nerven in de naaste omgeving (Fig. 11). Deze locale symptomen zijn evenwel niet altijd zo duidelijk waarneembaar.

Op de vroeger (VAN DER WANT, 1949) reeds onderzochte waardplanten voor PV2 werden nog enige keren inoculaties met de stammen TN en D uitgevoerd. Het betrof erwt (rassen Unica en Rondo), tuinboon (ras Driemaal Wit), bastaardklaver (*Trifolium hybridum* L.) en incarnaatklaver (*T. incarnatum* L.). Deze plantensoorten reageerden als voorheen met mozaiek op beide stammen. Er werd nog nader onderzocht of ook rode klaver (*T. pratense* L.) en witte klaver (*T. repens* L.) konden worden besmet, maar het gelukte nimmer PV2 in de geinoculeerde planten aan te tonen. HAGEDORN & WALKER (1950) isoleerden daarentegen een stam van PV2 (uit erwt) die wel kon worden overgebracht op rode klaver en HOUSTON & OSWALD (1953) konden PV2 in het witte klaverras Ladino aantonen. Mogelijk komen ook in Nederland stammen van PV2 voor, die rode en witte klaver onder hun waardplanten hebben. Slechts systematisch onderzoek van deze klaversoorten, verzameld in verschillende delen van het land zal hier nadere inlichtingen over kunnen geven.

Ten slotte werden met beide stammen van PV2 uiterst kleine, beige vlekjes met een paarsachtig randje op *Gomphrena globosa* L. verkregen. Deze vlekjes kwamen alleen op de geïnoculeerde bladeren voor. White Burley-tabak en komkommer konden daarentegen niet besmet worden.

2.3.2. *Eigenschappen van Phaseolus-virus 2 in vitro*

Op dezelfde wijze als voor PV1 beschreven in 2.2.2., werden de eigenschappen in vitro bepaald. Er werd uitgegaan van Servus-planten, die 3 weken tevoren met PV2 stam TN, respectievelijk stam D waren geïnoculeerd. De resultaten van deze proeven zijn samengevat in Tabel VI.

TABEL VI. Besmettelijkheid van sap van Servus-planten, respectievelijk besmet met *Phaseolus-virus 2* stam TN en stam D na verschillende behandeling

TABLE VI. *Infectivity of sap from Servus bean plants infected with Phaseolus virus 2 strain TN and strain D, respectively, after various treatments*

Sap verhit tot *sap heated to*	TN	D	Concentratie van sap *Concentration of sap*	Sap bewaard bij kamertemperatuur gedurende *Sap stored at room temperature for*							
				0 h		24 h		48 h		72 h	
				TN	D	TN	D	TN	D	TN	D
50° C	4/4[1])	1/4	onverdund *undiluted*	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	0/4
55° C	0/4	0/4	10^{-1}	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4
60° C	0/4	0/4	10^{-2}	4/4	1/4	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4
65° C	0/4	0/4	10^{-3}	2/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
70° C	0/4	0/4	10^{-4}	1/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

[1]) aantal planten met symptomen/aantal geïnoculeerde planten
number of plants showing symptoms/number of plants inoculated

Uit deze gegevens blijkt, dat stam D in lagere concentratie in het sap aanwezig is, dan stam TN. De inactiveringstemperatuur ligt voor beide virusstammen tussen 50° en 55 °C. Deze gegevens sluiten behoorlijk aan bij de door FRANDSEN (1952) vermelde eigenschappen van PV2.

2.3.3. *Overbrenging van Phaseolus-virus 2 door Myzus persicae Sulz. en Aphis fabae Scop.*

In 1952 werden enige proeven genomen aangaande de overbrenging van PV2 stam TN door *M. persicae* en *A. fabae*. De luizen hadden, voordat de proef begon enige uren gevast. Daarna zogen zij maximaal 15 sec. op de besmettingsbron en vervolgens passeerden zij een reeks van 6 planten, waarbij zij maximaal 15 sec. zuigtijd per plant kregen. Per plant passeerden 5 bladluizen. De resultaten van een dergelijke proef met *M. persicae* zijn weergegeven in Tabel VII, blz. 21. In de reeksen 1 t/m 4 behoorden de toetsplanten tot het ras Dubbele Witte z.dr.; in de overige tot het ras Beka. De besmettingsbron was 13 dagen eerder met PV2 stam TN geïnoculeerd; toen de betreffende Beka-plant werd gebruikt vertoonde zij een licht knijpen van het topblad met geringe nerfnecrose. Op dit topblad zogen de luizen.

Het resultaat van deze proef gelijkt volkomen op dat van de overbrengingsproeven met PV1 en wettigt de opvatting, dat PV2 evenals PV1 tot de non-persistente viren behoort.

Een soortgelijke proef met *A. fabae*, die een dag later als de proef met *M. persicae* werd uitgevoerd, had veel minder resultaat. In twee series van de vier met Dubbele Witte z.dr. als toetsplant werd overbrenging verkregen, nl. in één op de eerste en de tweede plant en in de andere alleen op de eerste, terwijl bij Beka slechts de eerste planten uit twee reeksen werden besmet.

In 1952 werden nog drie maal proeven met *M. persicae* en *A. fabae* uitgevoerd,

TABEL VII. Overbrenging van *Phaseolus-virus 2* stam TN door middel van *Myzus persicae* die minstens 1 uur heeft gehongerd. Iedere reeks bestaat uit 5 proefplanten, die na elkaar door 5 luizen zijn bezocht. Maximum zuigtijd steeds 15 sec.

TABLE VII. *Transmission of Phaseolus virus 2 strain TN by Myzus persicae which were fasted for at least 1 hour. Every series contains 6 test plants which were visited in succession by 5 aphids. Maximum infection and test feedings of 15 sec.*

reeks / *series* \ Plant	1	2	3	4	5	6
1	+ [1]	+	–	–	–	+
2	+	+	+	+	–	+
3	+	–	–	–	–	–
4	–	+	–	+	+	+
5	+	+	+	–	–	–
6	+	–	–	–	–	–
7	+	+	–	+	–	+
8	–	+	–	–	–	+

[1] + = toetsplant besmet; – = toetsplant niet besmet
+ = *test plant infected*; – = *test plant not infected*

elke keer met iedere soort in 4 reeksen van 6 planten, doch in deze werd geen enkele maal een overbrenging van PV2 geregistreerd. In al deze proeven werd de indruk verkregen, dat bepaalde, onbekende factoren van grote invloed zijn op de mate waarin dit virus wordt overgebracht. Ditzelfde kan men concluderen uit vele proeven, in 1954 met PV2 stam TN uitgevoerd. Van 18 Februari tot 18 Maart werd wekelijks getracht dit virus met *M. persicae* en *A. fabae* over te brengen. De besmettingsbron was een Beka-plant, op 16 Januari geïnoculeerd, die na aanvankelijke topnecrose enkele bladeren met scherpmozaïek had gevormd. In totaal waren in deze proeven 60 exemplaren van elke luizensoort betrokken, maar alle proefplanten bleven gezond. Positieve resultaten werden weer verkregen in Maart met als besmettingsbron een Beka-plant, die 5 weken eerder was geïnoculeerd en *M. persicae* als overbrenger. Nu bleken 4 van de 12 getoetste luizen het virus te hebben opgenomen.

Met Servus, besmet met PV2 stam TN werden evenmin veel positieve resultaten behaald. Zo kon in een proef van Maart (besmettingsbron 9 dagen eerder geïnoculeerd) slechts bij 3 van de 12 *M. persicae* worden aangetoond, dat ze het virus hadden opgenomen. Een gelijke slaging gaf *A. fabae*, die op dezelfde dag werd beproefd.

Ook werd gebruik gemaakt van gladiool als besmettingsbron met Beka als toetsplant en *M. persicae* als vector. Het betrof hier de gladiool, waar eerder, met behulp van perssap uit een ouder blad, PV2 stam D uit was geïsoleerd. De zuigtijd was op deze plant naar believen van de luizen, dat wil zeggen, zij werden er op gezet en geobserveerd. Het tijdsverloop gedurende hetwelk zij hun zuigsnuit op het blad plaatsten werd geregistreerd; trokken zij hun snuit terug, dan werden

zij overgebracht op de eerste toetsplant waar zich hetzelfde herhaalde, enz. Na vier keer zuigen op de toetsplant werden de luizen op een aparte plant de nacht over gelocaliseerd, waarna zij werden gedood.

Van een van de 16 luizen, die in deze proef werden gebruikt, werd aangetoond, dat zij PV2 uit de gladiool had opgenomen. Na de eerste en tweede keer zuigen op de toetsplant bleek nl. het virus te zijn „aangeslagen", terwijl tevens de plant waar zij op overnacht had, symptomen ging vertonen. Opmerkenswaard is, dat de symptomen, die aldus ontstonden, identiek waren aan die, welke de met sap uit dezelfde gladiool verkregen stam D bij Beka teweegbrengt. Dit zou er op kunnen wijzen, dat in de gladiool slechts één virusstam aanwezig is of een mengsel, waarin stam D sterk overheerst.

Bij de beschouwing van de hier gepresenteerde resultaten kan men verschillende zaken overwegen. De onbekende factoren, die in sterke mate de overbrenging bepalen kunnen op velerlei wijze werken; men heeft immers te maken met de besmette plant, het virus, de vector en de toetsplant. Er zijn nu verschillende mogelijkheden: 1. De besmette plant kan zodanig veranderen, dat het erin aanwezige virus voor de luis onbereikbaar wordt; 2. Het virus kan in een zodanige staat in de plant voorkomen, dat het door de luis niet kan worden opgenomen; 3. De luis wordt door bepaalde factoren beïnvloed in haar vermogen tot virusoverdracht; 4. De toestand van de toetsplant is van dien aard dat het door de luis ingebrachte virus niet kan „aanslaan".

Deze mogelijkheden zijn op zichzelf weer complex van aard en kunnen ook onderling interfereren. Een analyse zal uiterst moeilijk zijn en kan wellicht pas worden gegeven na verder experimenteel werk. Hoe het zij, uit de ervaringen, verkregen met PV2 moet men besluiten, dat „iets" de resultaten van de overbrenging van dit virus door *M. persicae* en *A. fabae* sterk kan beïnvloeden. Dit „iets" zou, gezien de betreffende resultaten vermeld in hoofdstuk 4, veel minder te betekenen hebben bij de overbrenging van PV1.

2.3.4. *Het optreden en de verspreiding van Phaseolus-virus 2 in het veld*

In 1949 werden dienaangaande enige veldproeven uitgevoerd, waarvan het resultaat hier zal worden weergegeven. Op een proefterrein te Wageningen bevonden zich op ongeveer 35 m van elkaar twee perceeltjes van 27 × 18 m. Op beide kwam overlangs in het midden een strook van 1 m breed met 4 rijen gladiolen voor, terwijl aan weerskanten 6 vakjes lagen. Op ieder vakje stonden 500 tot 700 planten van een der volgende bonenrassen: Dubbele Witte z.dr., Furore en Servus. Van elk ras waren dus in totaal per perceeltje 4 vakjes voorhanden. Het verschil tussen beide perceeltjes was, dat in het ene de gladiolen van het ras Sneeuwprinses, in het andere van het ras Nieuw-Europa waren. Beide rassen waren uit West-Friesland afkomstig.[1]) De knollen van het ras Sneeuwprinses kwamen van een partij die, volgens de ervaringen aldaar opgedaan, geen PV2 zou bevatten; die van het ras Nieuw-Europa uit een partij, waarnaast het jaar tevoren bonen een sterke afsterving te zien hadden gegeven.

De bonen waren half Mei gezaaid, terwijl de gladiolen ongeveer een maand eerder in de grond waren gebracht. Op het moment, dat de bonen gezaaid werden, waren de gladiolen reeds boven de grond. In de loop van Mei werden op de

[1]) Schrijver wil hier gaarne memoreren de medewerking, die verleend is door de Heren G. Houtman en Tj. Buishand van het Rijkstuinbouwconsulentschap te Hoorn, ter verkrijging van dit materiaal en hiervoor, ook op deze plaats, zijn erkentelijkheid betuigen.

Sneeuwprinses

	c	b	a	↓	a	b	c	
Servus	0–0	0–2	0–3		1–2	1–3	0–1	Servus
Dubbele Witte z. dr.	1–4	3–4	2–8		4–14	5–5	1–4	Dubbele Witte z. dr.
Furore	0–3	1–8	1–14		3–11	0–9	1–8	Furore
Servus	0–0	0–1	1–1		0–3	0–1	0–3	Servus
Dubbele Witte z. dr.	0–2	1–8	1–24		3–18	5–19	3–11	Dubbele Witte z. dr.
Furore	1–8	0–7	2–27		1–14	1–14	1–11	Furore

Nieuw-Europa

				↓				
Servus	3–23	5–44	16–73		11–46	4–22	3–9	Servus
Dubbele Witte z. dr.	7–58	30–91	57–100		49–100	20–65	10–38	Dubbele Witte z. dr.
Furore	11–65	21–84	47–93		36–73	19–69	16–76	Furore
Servus	3–21	9–38	21–61		18–66	4–32	4–31	Servus
Dubbele Witte z. dr.	11–40	34–72	57–92		42–100	21–63	9–36	Dubbele Witte z. dr.
Furore	7–57	13–76	32–86		34–53	18–74	8–79	Furore

Fig. 12. Percentages bonenplanten, aangetast door *Phaseolus-virus 2* in twee proefveldjes, respectievelijk met gladiolen van de rassen Sneeuwprinses en Nieuw-Europa als besmettingsbron. De veldjes met de bonenrassen Dubbele Witte zonder draad., Furore en Servus zijn elk in drie gedeelten verdeeld; in elk deel is het percentage met PV2-besmette bonenplanten op 5 en 16 Juli vermeld. De proeven werden in 1949 te Wageningen genomen.

Percentages of bean plants affected with Phaseolus virus 2 in two field trials from the gladiolus varieties Sneeuwprinses and Nieuw-Europa, respectively, The plots with the bean varieties Dubbele Witte z.dr., Furore, and Servus were all divided into three parts; the percentages of PV2-affected bean plants on July 5th and 16th, respectively, are indicated in each part. The trials were carried out in 1949 at Wageningen

gladiolen enige donkere bladluizen waargenomen, die op de planten jongen hadden afgezet. Volgens de Heer D. HILLE RIS LAMBERS, die ze determineerde, behoorden zij tot de soort *Aphis fabae* Scop.

Aan het einde van Juni werden de eerste topnecrotische en scherpmozaiek-zieke bonenplanten waargenomen. De grootste uitbreiding van de ziekte trad in Juli op. De meeste zieke planten kwamen in de bonen naast het gladiolenras Nieuw-Europa voor, maar dat de gebruikte partij Sneeuwprinses vrij was van PV2 kon niet worden gezegd. Hoogstens was het aantal besmette planten in dit ras geringer dan in NieuwEuropa. Fig. 12, blz. 23, geeft een duidelijk beeld van een en ander. Zij kan als een plattegrond van de twee perceeltjes worden beschouwd, maar er dient dan te worden bedacht, dat deze niet op schaal is getekend. Bij de telling van de zieke bonenplanten werden de vakjes met bonen evenwijdig aan de besmettingsbronnen in drie gelijke stroken verdeeld. In elk vakje werden op 5 en 16 Juli de zieke planten geteld en deze werden uitgedrukt als percentages van de aantallen planten, die in iedere strook van elk vakje voorkwamen. Zij zijn afgerond op eenheden.

Duidelijk blijkt, dat de verspreiding van het virus van de gladiolen uit is gegaan. Dat dit zeer snel kan geschieden wordt in het perceeltje met Nieuw-Europa gedemonstreerd. Hoewel iedere aangetaste bonenplant, voor zij geheel verdord is, zelf als besmettingsbron kan fungeren, blijft het effect van de „uitstraling" der besmetting uit de gladiolen toch duidelijk merkbaar. Het ras Servus reageerde op beide perceeltjes met scherpmozaiek, de beide andere rassen met hevige necrose, zoals reeds in 2.3.1. werd beschreven.

In 1954 werd opnieuw een veldproef genomen om de verspreiding van PV2 van gladiolen af over daarnaast gelegen stroken met bonen te observeren. Gemakshalve wordt deze veldproef de gladiolenproef genoemd, ter onderscheiding van de in 2.2.4. besproken proef aangaande de verspreiding van PV1 bij verschillende zaaitijden. Beide proeven lagen op hetzelfde terrein, maar ongeveer 100 m van elkaar verwijderd met daartussen allerlei gewassen, onder meer tabak en vlas.

De opzet van de gladiolenproef was als volgt: op een strook van 8 m lang en 50 cm breed bevonden zich drie rijen van met PV2 besmette gladiolen (ras Nieuw-Europa). De gladiolen werden omstreeks het einde van April geplant. Loodrecht op de besmettingsstrook kwamen de bonen (ras Dubbele Witte z.dr.) op regels van 5 m lengte. Drie rijen bonen werden op 14 Mei aan weerszijden van de gladiolen gezaaid. Op 21 en 28 Mei en op 4 en 11 Juni werden eveneens drie rijen bonen gezaaid; ten slotte op 18 Juni nog twee rijen. In totaal bevonden zich dus aan iedere kant van de gladiolen 17 rijen met bonen. Per zaaidatum ging het om 250 tot 300 planten, behalve in het geval van de op 18 Juni gezaaide bonen, waar het omstreeks 180 planten betrof.

Het ras Dubbele Witte z.dr. was gekozen, omdat het, zoals bekend, in het algemeen zeer heftig met topnecrose op PV2 reageert. Bovendien was het mogelijk de verspreiding van PV1 over het perceeltje na te gaan, omdat dit virus bij Dubbele Witte z.dr. rolmozaiek verwekt. Enkele tientallen meters van de gladiolenproef bevonden zich nl. landbouwstambonen, waar secundair met PV1 besmette planten onder voorkwamen. De kans was dus groot, dat dit virus zich ook in de bonen van de gladiolenproef zou voordoen. De kwaliteit van het gebruikte zaad van Dubbele Witte z.dr. was zeer goed; secundair met PV1 besmette planten werden nimmer waargenomen.

De gegevens over de aantallen zieke planten, die gedurende enige weken werden verzameld, zijn verwerkt in Tabel VIII. De eerste topnecrotische en rolmozaiekzieke planten werden op 2 Juli waargenomen. Op 9 Juli en 20 Juli waren er meer zieke planten te vinden. Pas 27 Juli bleek deze toeneming evenwel een grotere vorm te hebben aangenomen; toen waren alle planten ziek, d.w.z. iets minder dan de helft met PV2 en de rest met PV1.

TABEL VIII. Percentages bonenplanten (Dubbele Witte z. dr.) besmet met de *Phaseolus-viren 1* en *2* op een proefveld te Wageningen met gladiolen als besmettingsbron van *Phaseolus-virus 2*

TABLE VIII. *Percentages of French beans affected with Phaseolus viruses 1 and 2 in a field trial at Wageningen with gladioli as infection source for Phaseolus virus 2*

Bonen gezaaid *Beans sown*	Waarnemingen verricht *Observations on*							
	Phaseolus virus 1				Phaseolus virus 2			
	2 Juli	9 Juli	20 Juli	27 Juli	2 Juli	9 Juli	20 Juli	27 Juli
14 Mei	1,1	3,9	8	61	0,7	1,9	6,4	39
21 Mei	1,3	5,2	10,1	53	2,8	6,1	13,6	47
28 Mei	0,7	1,4	4,5	55	1,7	3,1	15,5	45
4 Juni	0,9	2,3	6,4	53	2,3	6,4	14,4	47
11 Juni	0	0	4,2	55	0	0,4	13,0	45
18 Juni	0	0	0,5	58	0	0	1,6	42

Uit de verdeling van de PV2-zieke planten, zoals die reeds op 2 Juli kon worden waargenomen, bleek duidelijk de besmetting uit de rij gladiolen afkomstig te zijn. De dichtheid der zieke planten was vlak bij de rij hoger dan verder er van af. PV1 kwam meer egaal verdeeld over het proefveldje voor. Dit virus was immers van buiten af ingebracht. Vergelijken wij de cijfers van Tabel VIII met die van Tabel IV waarin de verspreiding van PV1 over de vakjes in de zaaitijdenproef in dezelfde periode wordt weergegeven, dan valt het op dat PV2 zoveel langzamer wordt overgebracht. Er moet wel rekening mee worden gehouden, dat de bonenrijen in de gladiolenproef zich veel verder van de besmettingsbron verwijderden; een groot gedeelte van de planten bevond zich verder van de virusbron dan in het geval van de kleine vakjes der zaaitijdenproef. Dat het dicht-bij-de-hand-zijn van de besmettingsbron inderdaad een factor van betekenis is, blijkt wel uit het feit, dat ook PV1 zich in de gladiolenproef zo betrekkelijk traag manifesteerde. Dit moest nu over enige tientallen meters worden aangevoerd. Voor PV2 gaat dit evenwel niet ten volle op: er waren immers ook nauwelijks topnecrotische planten te bespeuren onder de bonen, die vlak aan de gladiolen grensden. Een verklaring hiervoor kan gezocht worden in de volgende feiten. Ten eerste moest het virus door bladluizen uit gladiolen worden opgenomen. Het is denkbaar, dat de verspreiding van het virus van de ene plantensoort op de andere minder gemakkelijk plaats kan hebben dan binnen eenzelfde soort, hoewel zij beide naast elkaar groeien. Ten tweede is uit de in 2.3.3. genoemde proeven gebleken, dat de pogingen om PV2 met behulp van bladluizen van boon op boon over te brengen in het algemeen veel minder resultaat opleveren dan in het geval van PV1. Met andere woorden, om eenzelfde besmettingseffect te bereiken zullen meer luizen moeten vliegen bij de overbrenging van PV2 dan bij de overbrenging van PV1.

Toen op 11 Augustus de gladiolenproef opnieuw werd opgenomen, bleek

duidelijk, dat verscheidene planten, die op 27 Juli rolmozaiekziek waren, thans ook topnecrose vertoonden. In de loop van Augustus nam het aantal topnecrotische planten geleidelijk aan verder toe, zodat ten slotte alle planten voortijdig afgestorven waren. Men zou kunnen aanvoeren, dat deze waarnemingen tegen het bestaan van premuniteit van PV1 ten aanzien van PV2 pleiten. Immers, de tevoren door PV1 besmette planten vielen toch aan PV2 ten prooi. Hiertegen kan worden aangevoerd, dat het begrip premuniteit in vele gevallen geen absolute bescherming inhoudt (THUNG, 1949; BAWDEN, 1950). Als het aantal inoculaties toeneemt wordt de kans groter dat een virus toch in een plant komt, die reeds door een verwant virus is bezet. En het aantal inoculaties met PV2, dat door de talloze bladluizen op de reeds met PV1 besmette planten werd verricht, was in 1954 bijzonder groot. Aldus kon ten slotte toch het voor de plant meest schadelijke virus de overwinning behalen. Juist de langzame toeneming van de topnecrose zou op een zekere bescherming door PV1 ten opzichte van PV2 kunnen wijzen. Ware dit niet het geval, in de gladiolenproef zouden waarschijnlijk reeds alle bonenplanten in de eerste week van Augustus dood zijn geweest.

3. HET WITTEKLAVERVIRUS

3.1. Inleiding

In 1953 onderzocht Prof. Dr J. W. OSWALD uit Davis (Californië) tijdens zijn verblijf te Wageningen, o.m. verscheidene witteklaverplanten op de aanwezigheid van virus. Zijn doel was, na te gaan in welke mate het lucernemozaiekvirus in Nederland voorhanden was en of er hier te lande verschillende stammen van dit virus konden worden onderscheiden. Van het lucernemozaiekvirus, dat op de met sap ingewreven bladeren van boon bruine vlekjes verwekt en dat ook op tabak kan worden overgebracht, komen nl. in de Verenigde Staten talrijke stammen o.a. op witte klaver voor (HOUSTON & OSWALD, 1953).

Onder de isolaties van lucernemozaiekvirus, die werden verkregen, werd door Prof. OSWALD ook een virus waargenomen, dat niet op tabak kon worden overgebracht en dat bij bonenplanten, na aanvankelijk zwakke necrose op de geïnoculeerde bladeren te hebben gegeven, ook een soort van zwak mozaiek als verspreidingssymptoom teweegbracht. Gezien het feit, dat het niet op tabak overging, kon worden geconcludeerd, dat het geen lucernemozaiekvirus betrof. Naar HOUSTON & OSWALD (1953) aantoonden was het mogelijk, dat het een stam van *Phaseolus-virus 2* was. Dit maakte deze isolatie interessant, aangezien het, zoals in 2.3.1. beschreven werd, nooit was gelukt de bestudeerde PV2-stammen op witte klaver over te brengen.

In de loop van het onderzoek werd het evenwel duidelijk, dat het virus in kwestie geen stam van PV2 was, maar dat het als een apart virus moest worden beschouwd.

Een mozaiekziekte van witte klaver werd beschreven door ZAUMEYER en WADE (1935) en PIERCE (1935). WEISS (1939) classificeerde de verwekker als *Trifolium-virus 1*. JOHNSON (1942) kon echter aantonen, dat dit virus in werkelijkheid uit twee componenten bestond, die o.m. met behulp van *Cuscuta campestris* Yunck. van elkaar konden worden gescheiden. Het virus, dat wel door middel van warkruid kon worden overgebracht werd „pea-mottle virus" en het andere „pea-wilt virus" genoemd.

In het in dit hoofdstuk te beschrijven, vrij fragmentarische onderzoek, dat

over het door Prof. Oswald geïsoleerde WKV werd verricht, is het waarschijnlijk geworden, dat dit virus ook thuis hoort in de groep, die vroeger als „*Trifolium-virus 1*" werd aangeduid. Er is evenwel niet uitgemaakt of dit in Wageningen bestudeerde virus een eenheid vormt, dan wel uit een mengsel van meer viren bestaat. Wel kan gezegd worden, dat de symptomen op Beka-boon, waar het virus op in stand werd gehouden, onveranderlijk dezelfde bleven ondanks de vele overbrengingen. Maar dit geeft geen absolute zekerheid, dat het toch geen mengsel was. Wanneer verder van witteklavervirus (WKV) wordt gesproken, blijft de mogelijkheid, dat het een mengsel is, voor ogen staan.

Met betrekking tot dit onderzoek kan vermeld worden, dat in 1947 van een witteklaverplant een virus werd verkregen, dat met sap op verschillende vlinderbloemigen kon worden overgebracht. Gemakshalve wordt dit virus (dat ook een mengsel kan zijn geweest) als WKV (1947) aangeduid. In 1951 werd er een antiserum tegen bereid, dat zeer specifiek reageerde met het sap van planten, die met dit virus besmet waren. Ondertussen was dit virus in 1952 verloren gegaan, maar daar het antiserum nog aanwezig was, kon een serologische vergelijking met het door Prof. Oswald geïsoleerde WKV worden uitgevoerd. Naar aanleiding hiervan zijn de symptomen van WKV (1947) op enige plantensoorten mede beschreven .

3.2. Symptomen en waardplantenreeks

Voor enige plantensoorten werd nagegaan of zij vatbaar waren voor de genoemde virusisolaties uit witte klaver. Vast staat, dat beide niet op White Burley-tabak konden worden overgebracht. Als waardplanten werden gevonden: boon (ras Beka), tuinboon (ras Driemaal Wit), erwt (rassen Rondo en Unica) en rode-, witte-, incarnaat- en bastaardklaver. Meer plantensoorten zijn niet onderzocht. WKV (1947) gaf in het algemeen geprononceerdere symptomen bij deze soorten dan de isolatie van 1953.

Op Beka-boon veroorzaakte WKV (1947) op de geïnoculeerde bladeren binnen een week diffuse, chlorotische vlekjes, die de neiging vertoonden in het centrum bruin te worden. Ook zwakke nerfnecrose kwam voor, terwijl een inwendige verbruining in de stelen der geïnoculeerde bladeren en later ook in de stengel kon worden waargenomen. Als verspreidingssymptoom in de bladeren traden pleksgewijs zwakke chlorotische verkleuringen in de nerven op met daarnaast donkerbruine vlekjes, omgeven door een lichter groene zone. De isolatie van 1953 veroorzaakte op boon na enkele dagen chlorotische vlekjes, waar later bruine randjes omheen ontstonden. Ook lichte necrose van de nerven trad op (Fig. 13). Verder werd later een inwendige verbruining in de stelen der geïnoculeerde bladeren opgemerkt, terwijl als verspreidingssymptoom diffuse chlorotische vlekjes en een dito verkleuring van nerfjes optraden. Bij het ouder worden van de planten werden de symptomen vaak minder duidelijk. Misvorming der bladeren werd bij geen der isolaties waargenomen.

Tuinboon Driemaal Wit reageerde op WKV (1947) met duidelijke, bruine, ringvormige vlekjes op de geïnoculeerde bladeren. Na 10 tot 14 dagen kwamen in de topbladeren onregelmatige, diffuse, chlorotische verkleuringen voor, die soms gepaard gingen met zwakke, onregelmatige, bruine vlekjes. Met de isolatie van 1953 werden op hetzelfde tuinbonenras veel minder scherpbegrensde locale vlekjes verkregen. De geïnoculeerde bladeren reageerden met onregelmatige, chlorotische en bruine lijntjes. Ongeveer 12 dagen na de inoculatie kwam een

zwakke, onregelmatige mozaiektekening in de topbladeren tot ontwikkeling. Necrose werd hierbij niet opgemerkt.

De erwtenrassen reageerden op beide isolaties gelijk, nl. met een verwelking en verdroging van de geïnoculeerde bladeren en een soort van chlorose in de topbladeren als verspreidingssymptoom. Opvallend was een sterke remming van de groei der aangetaste planten.

De klaversoorten, ten slotte, gaven alle na inoculatie met beide isolaties een mozaiek te zien. De tekening hiervan volgde de nervatuur in het blad. Het mozaiek dat door WKV (1947) teweeg werd gebracht was geprononceerder dan dat van de andere isolatie.

3.3. Eigenschappen in vitro en serologie

Voor de WKV-isolatie uit 1953 werden de eigenschappen op dezelfde wijze bepaald als verricht voor PV1 en PV2. Er werd uitgegaan van Beka-planten, die drie weken tevoren met WKV waren geïnoculeerd. De proefplanten waren eveneens Beka-bonen. De resultaten van deze proeven zijn in Tabel IX samengevat.

TABEL IX. Besmettelijkheid van sap van Beka-planten, besmet met een in 1953 uit witte klaver geïsoleerd virus, na verschillende behandelingen

TABLE IX. *Infectivity of sap from Beka bean plants infected with a virus isolated in 1953 from white clover, after various treatments*

sap verhit tot *sap heated to*		concentratie van sap *concentration of sap*	sap, bewaard bij kamertemperatuur gedurende *sap stored at room temperature for* 0 h	24 h	48 h	72 h
50 °C	4/4 [1])	onverdund *undiluted*	4/4	4/4	4/4	4/4
55 °C	2/4	10^{-1}	4/4	4/4	4/4	4/4
60 °C	3/4	10^{-2}	4/4	4/4	4/4	4/4
65 °C	0/4	10^{-3}	4/4	4/4	4/4	4/4
70 °C	0/4	10^{-4}	4/4	4/4	4/4	4/4

[1]) Aantal planten met symtomen/aantal geïnoculeerde planten
Number of plants showing symptoms/number of plants inoculated

De inactiveringstemperatuur van de isolatie van WKV uit 1953 ligt dus tussen 60 ° en 65 °C, de verdunningsgrens is bij 10^{-4} nog niet bereikt en het blijft bij bewaring bij kamertemperatuur minstens 3 dagen actief. Aangaande WKV (1947) kan worden opgemerkt, dat hier de inactiveringstemperatuur eveneens tussen 60 ° en 65 °C lag en de verdunningsgrens tussen 10^{-5} en 10^{-6}. Deze proef werd in 1951 uitgevoerd met sap van tuinboon Driemaal Wit, die vier weken tevoren met het virus was geïnoculeerd. Hetzelfde tuinbonenras was toen toetsplant.

In genoemde eigenschappen verschillen de virusisolaties van witte klaver dus duidelijk van de voor de PV1- en PV2-stammen vastgestelde gegevens. Daarentegen vertonen zij veel overeenkomst met de door JOHNSON (1942) vermelde eigenschappen van het „pea-mottle virus” en het „pea-wilt virus”. Deze zijn namelijk voor het eerstgenoemde virus: inactiveringstemperatuur 60 °–62 °C en verdunningsgrens 10^{-4} en voor het tweede virus respectievelijk 58 °–60 °C en 10^{-5}; beide viren zijn minstens 31 dagen in vitro bij kamertemperatuur houdbaar.

Ter winning van een antiserum werd een konijn in de oorader ingespoten met het sap van tuinbonenplanten, besmet met de isolatie uit witte klaver van 1953. Dit sap was vooraf gedurende enige uren in stromend leidingwater gedialyseerd.

Het schema van de inspuitingen was als volgt: 4 dagen achtereen een inspuiting, beginnende met 1 ml en toenemende tot 6 ml; vervolgens 3 dagen een pauze en daarna weer 4 dagen steeds een inspuiting van 6 ml. Een week na de laatste injectie werd het bloed gewonnen.

Het serum werd volgens de vereenvoudigde druppelmethode van VAN SLOGTEREN (in druk) op de aanwezigheid van antilichamen tegen WKV getoetst. Deze methode berust hierop, dat een druppel serum en een druppel sap, eventueel beide in verdunning, op de bodem van een petrischaal worden gemengd. De bodem is eerst waterafstotend gemaakt door er een uiterst dunne laag formvar op aan te brengen. Zijn de druppels gemengd, dan wordt er zoveel paraffine-olie in de schaal gegoten tot zij onder staan. Aldus worden de druppels tegen uitdroging beschermd.

Verzadiging van het serum bleek te zijn geschied na menging van 1 deel serum met 2 delen sap van gezonde Beka-boon. Het gaf toen geen reactie meer met het sap van gezonde Beka-planten. De serologische reacties werden nl. niet verricht met het sap van zieke en gezonde tuinbonen, aangezien dit de onaangename eigenschap heeft spoedig inktachtig te verkleuren (BAWDEN, CHAUDHURI & KASSANIS, 1951).

Ter vergelijking waren nog voorhanden: een antiserum tegen PV2, afkomstig van het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse [1]), een antiserum tegen een stam van lucernemozaiekvirus, door Prof. OSWALD te Wageningen bereid, en een antiserum, in 1951 verkregen tegen het later verloren gegane virus, dat in 1947 uit witte klaver was geïsoleerd. Voorts waren er nog de gebruikelijke contrôles van normaalserum en physiologische zoutoplossing.

De volgende viren werden in de serologische toetsproeven gebruikt: WKV, vermeerderd in Beka-boon; lucernemozaiekvirus, vermeerderd in White Burley-tabak; de PV2-stammen TN en D vermeerderd in Servus-bonen. Voorts was er sap van gezonde White Burley, gezonde Beka en gezonde Servus. De resultaten van de enige keren herhaalde proeven wezen alle in dezelfde richting en zijn weergegeven in Tabel X.

TABEL X. Serologisch onderzoek van lucernemozaiekvirus (LMV), *Phaseolus-virus 2* (PV2) en een virus uit witte klaver (WKV)

Serology of lucerne mosaic virus (LMV), Phaseolus virus 2 (PV2), and a virus isolated from white clover (WKV)

Sap van / *Sap from* — Antisera tegen / *Antisera against*	White Burley met *with* LMV	Servus met *with* PV2	Beka met *with* WKV	White Burley gezond *healthy*	Servus gezond *healthy*	Beka gezond *healthy*	Phys. zoutopl. *saline*
LMV	+ *)	–	–	–	–	–	–
PV2	–	+	–	–	–	–	–
WKV (isolatie 1953) .	–	–	+	–	–	–	–
WKV (isolatie 1947) .	–	–	+	–	–	–	–
Normaal serum . . . *Normal serum*	–	–	–	–	–	–	–
Physiol. zoutopl. . . *Saline*	–	–	–	–	–	–	–

*) + = positieve reaction; – = geen reactie
+ = *positive reaction;* – = *no reaction*

[1]) Schrijver wil ook gaarne op deze plaats Prof. Dr E. VAN SLOGTEREN hartelijk danken voor het beschikbaar stellen van dit serum.

Het sap van de besmette en de gezonde planten werd 45 min. bij 12.000 toeren per min. gecentrifugeerd. De sera waren alle vooraf gemengd met 2 delen sap van gezonde Beka. Dit sap was vooraf met een gelijk volumen physiologische zoutoplossing verdund. De mengsels serum-sap van gezonde Beka-planten stonden daarna enige uren bij kamertemperatuur en werden vervolgens gedurende 45 min. bij 12.000 toeren per min. gecentrifugeerd. De mengsels van druppels verzadigd serum en sap van de te toetsen planten verbleven eerst 20 min. bij 37 °C en werden daarna met een binoculaire loupe bekeken. Vervolgens bleven zij nog enige uren bij kamertemperatuur staan, waarna zij opnieuw werden geobserveerd. Meestal veranderde er in die tijd in principe weinig.

Uit het resultaat van deze proeven kan worden besloten, dat elk virus zeer specifiek met het eigen antiserum reageert en tevens, dat de isolatie van 1953 van WKV niet alleen een duidelijke reactie geeft met het homologe serum, maar ook met het serum tegen de verloren gegane isolatie. Hieruit kan worden besloten, dat beide isolaties verwant zijn, of verwante componenten bevatten, indien men zou moeten aannemen, dat het mengsels van viren betrof.

Over de aard van de reacties kan nog het volgende worden opgemerkt. Het neerslag van het lucernemozaiekvirus met zijn serum was fijn en granulair. Het neerslag, dat WKV met zijn eigen serum en met dat van WKV (1947) gaf, was geheel anders; het bevond zich in de druppels als een soort van sterk geplooid wit vel of vlies. Het neerslag van PV2 met zijn serum was fijn vlokkig. Dit virus gaf vaak minder goede resultaten. Een duidelijke verbetering werd soms verkregen wanneer het sap van de met PV2 besmette bonenplanten vooraf gedurende enige uren in stromend leidingwater was gedialyseerd. Evenwel, na dialyse bleven enige malen positieve reacties uit, waarschijnlijk als gevolg van het feit, dat soms bij het heldercentrifugeren van het sap een belangrijk deel van het daarin aanwezige virus met de vaste sapbestanddelen sedimenteerde.

De resultaten wijzen duidelijk uit, dat WKV geen serologische verwantschap met lucernemozaiekvirus en PV2 heeft.

3.4. Overbrenging van het witteklavervirus door *Myzus persicae* Sulz. en *Aphis fabae* Scop.

Er werd getracht de isolatie, die in 1953 van WKV was verkregen, op de wijze, zoals voor PV1 en PV2 beschreven, over te brengen door middel van *M. persicae* en *A. fabae*. In Januari 1954 zogen deze luizen op het topblad van een Beka-plant, die 11 dagen eerder met WKV was geïnoculeerd; dit blad gaf reeds verspreidingssymptomen te zien. De zuigtijd van de luizen op de besmettingsbron en toetsplanten was maximaal 15 sec. Iedere luis zoog viermaal op een toetsplant. Beide luizensoorten werden elk met 12 exemplaren beproefd. Slechts één van de proefplanten, waar *M. persicae* op had gezogen, ging de typische symptomen van WKV vertonen, nl. het diffuse nervenmozaiek. Op het enkelvoudige blad, waar de luis de vierde maal had gezogen, kwam een zeer geringe nerfnecrose voor, terwijl ook een necrose in de steel van dit blad werd waargenomen. Geen der *A. fabae* had het virus overgebracht.

Een nieuwe proefreeks werd in Mei 1954 uitgevoerd, met 32 *M. persicae* en 16 *A. fabae*. Iedere luis kon toen één keer naar believen op de besmettingsbron zuigen en daarna vier maal naar believen op een proefplant. De besmettingsbron was een Beka-plant, die 16 dagen eerder met WKV was geïnoculeerd.

Slechts twee luizen van de soort *M. persicae* brachten het virus over. De twee

betreffende proefplanten vertoonden het diffuse nervenmozaiek; locale verschijnselen werden echter niet opgemerkt, maar ook bij overbrenging met sap waren deze soms minder duidelijk. De zuigtijden van beide luizen op de virusbron waren respectievelijk 20 en 29 sec. Geen der 16 gebruikte *A. fabae* bracht WKV over.

WKV kan dus, zij het moeilijk, door *M. persicae* worden overgebracht; voor *A. fabae* werden hier geen aanwijzingen voor verkregen.

4. ONDERZOEKINGEN OVER DE OVERBRENGING VAN TWEE STAMMEN VAN PHASEOLUS-VIRUS 1 DOOR DE BLADLUIZEN MYZUS PERSICAE SULZ. EN APHIS FABAE SCOP.[1])

4.1. Inleiding

Sedert de onderzoekingen van WATSON (1936; 1938) en van WATSON & ROBERTS (1939, 1940) leidden tot de onderscheiding van de door insecten overgebrachte plantenviren in persistente en non-persistente viren, is gebleken, dat vele dezer smetstoffen tot de tweede groep behoren. Onder een non-persistent virus wordt een virus verstaan, dat door de vector in een korte tijd (enkele minuten) van zuigen uit een besmette plant kan worden opgenomen en dat in een gelijkelijk korte tijd aan een gezonde plant kan worden afgestaan. De duur van de zuigtijd op de besmettingsbron is hierbij mede van betekenis, want als deze toeneemt, vermindert het vermogen van de luis, het virus over te brengen. De luis die het virus heeft opgenomen, is echter na betrekkelijk korte tijd niet meer in staat besmetting teweeg te brengen. Blijkbaar is de hoeveelheid smetstof, waarmee infectie kan worden veroorzaakt, na verloop van tijd uitgeput.

De non-persistente viren kunnen in het algemeen tevens gemakkelijk met sap worden overgebracht. Zij zijn evenwel betrekkelijk instabiel in vitro; veelal zijn zij in sap bij kamertemperatuur niet langer dan enkele etmalen houdbaar.

De persistente viren kunnen in het algemeen niet in de korte periode van enkele minuten zuigen door de vector worden opgenomen, doch er zijn langere tijden vereist. Voorts blijkt de vector van een persistent virus meestal niet in staat te zijn de smetstof direct na het verlaten van een besmette plant aan een gezonde te kunnen afstaan, maar verloopt er een zogenaamde latente periode, eer hij wel hiertoe in staat is. Daarentegen kan een luis, wanneer zij een persistent virus heeft opgenomen en de latente periode verstreken is, dit virus gedurende een zeer lange tijd hierna overbrengen. De meeste persistente viren kunnen niet met sap worden overgebracht.

BAWDEN (1950) heeft er op gewezen dat de non-persistente viren een beperktere groep vormen dan de persistente, aangezien de vectoren ervan tot de bladluizen (Aphididae) behoren, met uitzondering van het „swollen shoot"-virus van de cacao dat door bepaalde Coccidae wordt verspreid. Tot de persistente behoren daarentegen viren die door bladluizen, of door cicade-achtigen, of door thripsen worden overgebracht.

[1]) Schrijver wil ook op deze plaats gaarne zijn dank betuigen aan de Heer D. HILLE RIS LAMBERS voor zijn grote belangstelling in dit deel van het onderzoek en voor de vele nuttige wenken, die hij heeft gegeven.

Aangaande de non-persistente viren is het bekend dat een vastperiode van de luis, voordat zij op de besmette plant zuigt, van grote betekenis is voor haar efficiëntie als vector. Het aantal geslaagde infecties wordt, met toenemende hongertijd, tot een bepaalde waarde groter. Dit in tegenstelling tot de overbrenging van persistente viren, waar het al dan niet vasten geen betekenis voor heeft. WATSON & ROBERTS (1940) hebben geconcludeerd, dat het met het oog op de grote invloed van het vasten niet waarschijnlijk was, dat non-persistente viren zuiver mechanisch van plant op plant zouden worden overgebracht, maar dat er een diepere relatie van deze viren tot hun vector zou bestaan, temeer daar bij verschillende luizensoorten de efficiëntie in de overbrenging van een bepaald virus, na een vasperiode niet voor alle eender is.

Ter verklaring van haar waarnemingen over de invloed van het vasten op de slaging van de overbrenging van het non-persistente *Hyoscyamus-virus III* door *Myzus persicae* kwam WATSON (1938) tot de veronderstelling dat er door het zuigende insect een stof wordt afgescheiden, die het virus onwerkzaam maakt. In deze opvatting is zij door later onderzoek, mede in samenwerking met ROBERTS, gestijfd. Na hongering zou deze stof niet of in te geringe concentratie aanwezig zijn; het virus zou dan actief blijven en dus na overbrenging op een gezonde plant infectie teweeg kunnen brengen. Dat bepaalde luizensoorten minder in staat zijn tot overbrenging van bepaalde plantenviren dan andere soorten, zou verklaard kunnen worden uit een sterkere afscheiding van inactiverende stof bij de eerste dan bij de laatste. Bovendien zou de ene luizensoort sneller met haar stiletten in het blad de plaats kunnen bereiken, waar het virus voorhanden is en aldus het virus hebben kunnen opnemen, voordat de secretie van inactiverende stof te ver is voortgeschreden. Microscopisch onderzoek van ROBERTS (1940) toonde in dit verband aan, dat er verschillen kunnen zijn in de wijze waarop de bladluis met haar stiletten in het blad binnendringt: *Myzus persicae* en *Macrosiphum gei*[1]) bleken in meer dan 50% van de onderzochte gevallen intracellulair binnen te dringen en *Myzus circumflexus* in minder dan 50%; bovendien was de afstand, waarover *M. circumflexus* in 5 min. binnendrong iets groter dan die van *M. persicae*.

De door WATSON & ROBERTS toegepaste zuigtijden waren reeds kort, maar latere onderzoekers (SYLVESTER, 1949, 1952; BRADLEY, 1952) hebben de zuigtijden nog korter gekozen, nl. tot perioden van onderdelen van een minuut. Dit maakte een nog nauwkeuriger observatie van de in de proeven gebruikte bladluizen noodzakelijk, ten einde precies de tijd te bepalen gedurende welke de luizen hun zuigsnuit op het blad lieten rusten en men kon aannemen, dat de stiletten in het blad staken. Uit deze proeven bleek nu, dat het opnemen en het afstaan van een non-persistent virus een kwestie van een paar tientallen seconden is, in plaats van minuten.

BRADLEY (1953, 1954) heeft ook gegevens verzameld, die belangrijk zijn voor de verklaring van de overbrenging van non-persistente viren. Hij nam waar, dat alleen die exemplaren van *Myzus persicae*, zuigende op tabaksplanten besmet met aardappel Y-virus, tot overbrenging van dit virus in staat waren, welke hun stiletten tot hoogstens 25μ in het blad hadden gebracht. Dit correspondeert met een afstand, die niet veel dieper dan de epidermis reikt. Worden de stiletten verder dan 25μ in het blad gebracht, dan neemt het vermogen, het

[1]) *M. gei* moet, volgens mondelinge mededeling van de Heer D. HILLE RIS LAMBERS, *M. euphorbiae* Thos. heten, en *M. circumflexus: Neomyzus circumflexus* Buckton.

virus over te brengen sterk af. BRADLEY (1952) nam reeds op grond van microscopisch onderzoek aan, dat luizen, die slechts in de epidermis prikken geen of nauwelijks speeksel afscheiden. Uit eerdere onderzoekingen (o.a. ROBERTS, 1940) was duidelijk geworden, dat een luis bij dieper doordringen speeksel produceert, dat in het blad tot een zogenaamde speekselschede verhardt. BRADLEY (1954) onderstelt nu, dat de aanwezigheid van de speekselschede het opnemen van virus zou kunnen hinderen, terwijl het speeksel zelf reeds opgenomen virus zou kunnen inactiveren. Of in andere woorden: het virus zou alleen in actieve toestand kunnen worden opgenomen als speeksel en speekselschede ontbreken.

Op de vraag, waar het non-persistente virus in de luis blijft en hoe het virus door de luis wordt geïnoculeerd, is uit de literatuur geen duidelijk antwoord te krijgen. Zoals bekend bevatten de maxillaire stiletten, die als het ware een geheel vormen, een voedsel- en een speekselkanaal. Een directe verbinding tussen deze kanalen in de zuigsnuit is nimmer vermeld. De vroegere opvatting was dan ook, dat het virus via het voedselkanaal in de maag terecht zou komen, dan de maagwand zou passeren en vervolgens via de bloedvloeistof de speekselklier zou bereiken om dan via het speekselkanaal te kunnen worden uitgescheiden. Deze voorstelling past echter niet bij het snelle tempo, waarin de overbrenging kan plaats hebben. Met betrekking hiertoe concludeert BRADLEY (1952) dat het virus wel niet verder zal komen dan de zuigsnuit. Hierbij zou het kunnen gebeuren, dat virus uit de besmette plant in een der beide kanalen terecht komt en van daaruit weer direct zou kunnen worden uitgescheiden, zonder eerst de tocht door het lichaam te hebben gemaakt. Men moet echter op grond van andere onderzoekingen aannemen, dat het zeer onwaarschijnlijk is, dat sap via het speekselkanaal naar binnen zou kunnen komen of via het voedingskanaal terug naar buiten. Er heerst nl. een sterk eenrichtingsverkeer in ieder kanaal, dat gecontroleerd wordt door een klepsysteem in de speekseltoevoer enerzijds en de kracht waarmee de plant perst anderzijds.

Op een essentiëel punt is dus de voorstelling aangaande de overbrenging van de non-persistente viren nog onvolkomen.

In het bovenstaande is enigszins uitvoerig op de theorieën aangaande de overbrenging der non-persistente viren ingegaan, omdat zij in de nabespreking van het eigen werk weer ter sprake zullen komen.

Het eigen werk bestond in eerste instantie uit een uitvoeriger onderzoek aangaande de overbrenging van de PV1-stammen W en RM door *Myzus persicae* en *Aphis fabae*. Zoals in 2.2.3. reeds werd aangetoond is PV1 een non-persistent virus.

De gegevens die werden verzameld, laten o.m. toe enige beschouwingen te geven over de overbrenging van de non-persistente viren.

4.2. Algemene methode van onderzoek

De bladluizen, die werden gebruikt, waren in kooien van kaasdoek op virusvrije planten vermeerderd, nl. *Myzus persicae* op stoppelknol of *Capsicum* en *Aphis fabae* op tuinboon[1]). Gedurende de wintermaanden kregen deze planten een bijbelichting met fluorescentielampen. Voor de proeven werden hoofdzake-

[1]) Gaarne wil schrijver ook hier dank brengen aan de Heer W. VAN SOEST voor het kweken en steeds in voldoende mate ter beschikking stellen van de benodigde bladluizen.

lijk ongevleugelde, volwassen dieren gebruikt. Sporadisch bevonden zich wel eens exemplaren in het 4e larvestadium onder de bladluizen. Nadat de luizen van de planten waren genomen, werden zij gedurende de hongerperiode in petrischalen bewaard. De hongerperiode der luizen was in alle proeven minstens 1 uur. In enkele proeven, die in het begin van het onderzoek werden genomen, werd gedurende de gehele dag gebruik gemaakt van een voorraad luizen, die 's morgens was verzameld. Zo kon de hongerperiode op het einde van de middag tot 6 uur en zelfs langer zijn toegenomen. In verreweg de meeste proeven is naar groter uniformiteit gestreefd, door alleen van luizen uit te gaan, die minstens 1 en hoogstens 2 uur hadden gevast. Een regelmatige aanvoer van bladluizen, afkomstig van de virusvrije kweek, waarborgde een vlot verloop van de proeven. Overigens is nimmer onderzocht of deze uniformiteit in vasttijd inderdaad noodzakelijk was voor het verkrijgen van vergelijkbare gegevens.

De besmettingsbron bestond steeds uit bonenplanten van het ras Beka, respectievelijk besmet met de stammen W en RM van PV1. De planten, die als besmettingsbron zouden fungeren, waren als jonge planten in het enkelvoudige-bladstadium door middel van sap met de betreffende viren geïnoculeerd. De luizen zogen doorgaans op het eerste drietallige blad. Als proefplanten werden steeds Beka-bonen gebruikt, die goed-ontplooide enkelvoudige bladeren bezaten. De luizen kregen gelegenheid hierop te zuigen.

De bladluizen werden, nadat zij met behulp van een penseel op een blad van de besmettingsbron of van de toetsplant waren geplaatst, met een loupe geobserveerd. Zoals reeds door Bradley (1952) is vermeld, gaat een luis na het vasten niet direct voorgoed zuigen, als zij op een blad wordt geplaatst, maar brengt zij voor korte tijd (doorgaans aanzienlijk minder dan een minuut) de top van haar zuigsnuit in aanraking met het blad. Gedurende deze korte tijd zit de luis rustig met de antennen naar achteren. Kort voordat de zuigsnuit weer wordt opgebeurd, gaan de antennen bewegen. Het is alsof het terugtrekken van de stiletten gepaard gaat met een beweging van de antennen. Het is niet bekend of de luis in deze korte tijd vloeistof uit de cel in de maag opneemt, maar, gezien de gegevens in de inleiding vermeld, moet men wel aannemen, dat in deze periode de luis virus uit de besmette plant opneemt, respectievelijk aan de toetsplant afgeeft. Vanwege de zeer korte tijd, die met dit „proeven" van de bladluis gemoeid is, heeft Bradley (1952) de term „feeding puncture" gebruikt.

Steeds werd de duur van deze „priktijden" op de besmette planten en op de proefplanten met behulp van een stophorloge geregistreerd, alsmede de duur van de onderbreking tussen het opbeuren van de zuigsnuit (na de laatste prik) en het weer plaatsen voor de volgende[1]).

In het algemeen kreeg iedere luis na het zuigen op de besmettingsbron gelegenheid viermaal te zuigen op een toetsplant, te weten eenmaal op elke helft van de twee enkelvoudige bladeren. In een aantal proeven werden de luizen daarna dood gemaakt. In andere proeven werden zij evenwel na viermaal zuigen op de toetsplant op een blad van een andere bonenplant tot de volgende dag gelocaliseerd volgens de methode van Walrave (1951), waarna zij werden gedood, evenals de eventueel op dit blad voortgebrachte jonge luizen.

[1]) Schrijver is zeer veel dank verschuldigd aan Mejuffrouw Tan Tian Nio voor het vele geduld en de grote zorgvuldigheid, waarmee zij bij de talloze proeven heeft geassisteerd, alsmede voor het organisatietalent, waarmee zij steeds zorgde voor proefplanten op het juiste ogenblik.

In enige proeven werden de luizen na het zuigen op de besmettingsbron overgebracht op het blad van een toetsplant en, na een korte zuigtijd, op het blad van een andere toetsplant, enz. De plaats waar de luis gezogen had, werd gemerkt met Oostindische inkt. De tweede luis van de proefserie volgde na het zuigen op de besmette plant dezelfde reeks, die uit 20 planten bestond. Aldus passeerden vier of vijf luizen deze reeks. Aangezien het bonenblad met een verkleuring reageert waar PV1 door de luis werd ingebracht, kon later op eenvoudige wijze worden nagegaan, bij welke gelegenheid de luizen infectie hadden veroorzaakt.

In verscheidene proeven werd de luizen toegestaan maximaal 15 sec. te prikken, zowel op de besmettingsbron als op de toetsplanten.

Prikten zij korter, dan deden zij dit vrijwillig; hadden zij hun zuigsnuit 15 sec. op het blad gebracht, dan werden zij met het penseel verwijderd, zodat de zuigperiode voor de luis onvrijwillig werd beëindigd. In de latere proeven hadden de bladluizen steeds gelegenheid naar believen te zuigen.

Myzus persicae prikte in verreweg de meeste gevallen na plaatsing op een blad spoedig. *Aphis fabae* had daarentegen vrij dikwijls nukken. De dieren bleven dan lang op de bladeren rondlopen zonder de minste neiging om hun snuit op het blad te plaatsen. Werd dit reeds waargenomen na plaatsing van het proefdier op de besmettingsbron, dan werd de luis gedood en een nieuwe poging gedaan met een ander exemplaar. Voorts werd soms waargenomen, dat *Aphis fabae* met de snuit wel het blad aftastte, zonder evenwel tot rust te komen. Deze onrust kon verscheidene seconden duren. Aangezien het ook vaak voorkwam, dat *Aphis fabae* deze onrust niet vertoonde, kwam de vraag op, waar zij aan geweten moest worden. Een antwoord kan hierop niet gegeven worden. De temperatuur bleek binnen het bereik waaronder werd gewerkt (van ong. 15° tot 25° C) van geen invloed hierop te zijn, aangezien bij een temperatuur van b.v. 17° C zich het verschijnsel de ene keer wel, de andere keer niet voordeed. Vermoed wordt, dat de geschetste onrust samenhangt met de omstandigheden, waaronder de luizen verkeerden op de planten, waar zij op waren vermeerderd. Dat wil zeggen, of zij afkomstig waren van planten, die eerst kortgeleden waren gekoloniseerd, of dat zij van oudere planten waren genomen, waarop zich vele luizen bevonden en waar de voedselvoorziening wellicht ongunstiger was.

4.3. De proeven en hun resultaten

4.3.1. *Over het optreden van een locale reactie*

Uit de in Hoofdstuk 1 beschreven proeven, waarin PV1 met sap op bonen werd geïnoculeerd, bleek, dat na verloop van tijd de ingewreven bladeren chlorotische verkleuringen en ook afstervingverschijnselen gingen vertonen. Deze locale reactie trad doorgaans pas op, als de verspreidingssymptomen reeds zichtbaar waren. Aangezien soortgelijke verschijnselen ook op in het veld groeiende bonenplanten, besmet met PV1, kunnen worden waargenomen, werd aangenomen, dat deze de reactie zouden vormen van de plant op de plaats waar de bladluis het virus had ingebracht. Voor het onderzoek aangaande de overbrenging van PV1 zou het belangrijk zijn, indien de proefplanten niet alleen met symptomen in de topbladeren zouden reageren, maar ook een reactie zouden vertonen waar de inoculatie door middel van de bladluis had plaats gehad.

Om dit nader te toetsen werden de volgende proeven genomen. *M. persicae*

en *A. fabae*, die minstens een uur en maximaal twee uur hadden gehongerd, konden stuk voor stuk maximaal 15 sec. zuigen op een gezonde plant. Daarna zoog elk van de luizen hoogstens 15 sec. op een enkelvoudig blad van een proefplant. Vervolgens kregen zij een rustpauze van een tot twee uur in een glazen buisje, waarna zij tot 15 sec. konden zuigen op het eerste (enige) drietallige blad van jonge Beka-planten, die 18 dagen eerder met stam W of stam RM waren geïnoculeerd. Van deze besmette plant kwam iedere luis op het andere enkelvoudige blad van de proefplant waar zij ook maximaal 15 sec. kon zuigen. Hierna werden de luizen gedood. Een tweede serie had dezelfde opzet, evenwel met het verschil, dat de luis zowel vóór als na de rustpauze op een gezonde plant zoog. De plekken, waar de luizen hadden gezogen, werden steeds met Oost-indische inkt gemerkt. Iedere keer werd een reeks met 25 bladluizen gemaakt.

Het resultaat van deze proef was, dat enige van de toetsplanten symptomen van rolmozaiek gingen vertonen en dat dit samenging met een meer of minder sterk zich over het enkelvoudige blad uitbreidend chlorotisch nerfpatroon, dat soms uiteindelijk gepaard ging met een necrose van nerven en het naaste bladmoes (Fig. 15). Deze verschijnselen traden evenwel slechts op die bladeren van de zieke planten op, waar de luizen na bezoek op de virusbron hadden gezogen. Geen der bladeren, waarop luizen hadden geprikt na het korte verblijf op een gezonde plant gaven deze locale verschijnselen te zien. De aantallen zieke planten waren als volgt: Stam W met *M. persicae* 11 en met *Aphis fabae* 6; stam RM 9 en 6, respectievelijk.

Uit het resultaat van deze proef kan worden geconcludeerd, dat de inoculatie van bonenbladeren met de PV1-stammen W en RM door middel van *M. persicae* en *A. fabae* gepaard gaat met een locale reactie, wanneer er besmetting is opgetreden.

Ook in de latere proeven bleek het optreden van PV1-symptomen in de top van de planten steeds samen te gaan met het tevoorschijn komen van het zojuist geschetste verschijnsel op die bladeren waarop de luizen hadden gezogen.

4.3.2. *Gebruik van toetsplanten van verschillende leeftijd*

Deze proef werd alleen met PV1 stam W uitgevoerd. Besmettingsbron was een Beka-plant, die 17 dagen eerder met dit virus was geïnoculeerd. De toetsplanten waren alle nog in het enkelvoudige-bladstadium, maar hun leeftijden verschilden. Een deel van nl. 15 dagen oud (stadium I, dat wil zeggen, de proef werd 15 dagen na het te kiemen leggen van de bonen gedaan), een deel 18 dagen oud (stadium II) en een deel 20 dagen oud (stadium III). Deze leeftijdsverschillen kwamen tot uiting in de grootte van de enkelvoudige bladeren (Fig. 16). Er werd een serie met *M. persicae* en een met *A. fabae* afgewerkt. Na een korte zuigtijd op de besmettingsbron (maximaal 15 sec.) zoog iedere luis viermaal op een toetsplant (op elke helft van de enkelvoudige bladeren eenmaal). Iedere prik duurde ook hier maximaal 15 sec. Later werd van de zieke planten opgenomen op welke plaatsen locale verkleuringen zichtbaar waren. Elke serie werd met 12 planten en 12 bladluizen uitgevoerd. De resultaten van de proef zijn samengevat in Tabel XI, blz. 38. Uit deze gegevens blijkt geen duidelijk verschil bij gebruik van proefplanten met de gegeven leeftijdsverschillen. De variatie in de besmetting, die hier merkbaar is, zal ook uit de later te noemen proefresultaten blijken en is in overeenstemming met de gegevens, die BRADLEY (1952) voor *M. persicae* en een virus van *Datura stramonium* verkreeg.

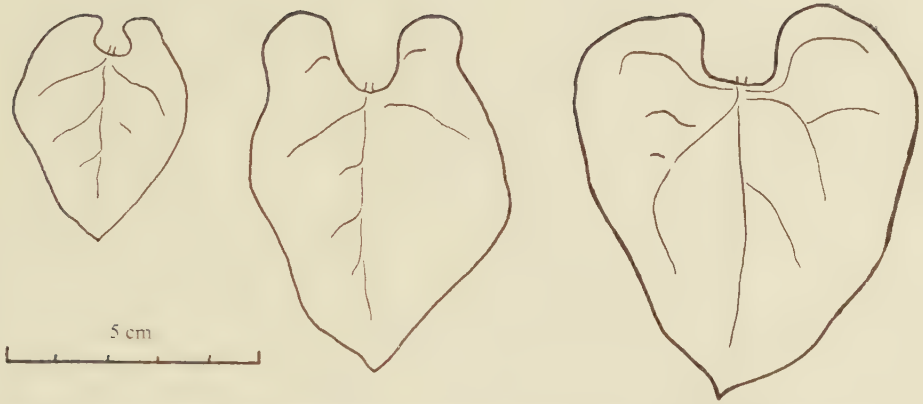


Fig. 16. Beka-bladeren van verschillende leeftijd, nl. van planten 15, 18 en 20 dagen oud (v.l.n.r.).
Beka leaves from plants of different ages, left to right: from 15, 18 *and* 20 *day old plants.*

4.3.3. *Hoeveel planten kan Myzus persicae Sulz. besmetten na Phaseolus virus 1 stam RM te hebben opgenomen?*

De proef werd uitgevoerd in Februari 1953 met een Beka-plant, die 21 dagen eerder met een stam RM was geïnoculeerd. Er waren twee series, elk van 20 proefplanten en per serie werden 5 exemplaren van de soort *M. persicae* gebruikt. De zuigtijden waren maximaal 15 sec. en de plaatsen, waar de luizen op de toetsplanten hadden gezogen werden gemerkt. Dit geschiedde nauwkeurig, daar er thans 5 luizen steeds over twee bladeren moesten worden verdeeld. Derhalve werden de luizen gedwongen op zover mogelijk van elkaar afliggende plaatsen te zuigen.

Van de 10 gebruikte luizen bleken er 7 infecties tot stand te hebben gebracht. In Tabel XII, blz. 39, is het beeld, dat met deze 7 luizen werd verkregen, weergegeven. De duur der tussenpozen tussen twee zuigtijden is hier niet vermeld. De langste pauze bleek in deze proef 180 sec. en de kortste 16 sec. te bedragen, maar de lengte van de meeste tussenpozen schommelde tussen 30 en 50 sec.

Uit Tabel XII blijkt duidelijk, dat *M. persicae* vele planten kan besmetten na slechts maximaal 15 sec. op een met PV1-besmette plant te hebben gezogen. Hoewel luis no. 5 nog in staat was de 19e plant in successie te besmetten en deze luis misschien, bij meer geduld, nog meer infecties had kunnen veroorzaken, demonstreert de tabel duidelijk, dat het aantal infecties afneemt, naarmate de luis meer planten is gepasseerd. Het is opmerkelijk, dat er soms verscheidene planten niet worden besmet. Een soortgelijk verschijnsel is reeds door WATSON & ROBERTS (1940) bij de overbrenging van andere non-persistente viren door *M. persicae* waargenomen.

Ook blijken duidelijk de individuële verschillen tussen de luizen in hun vermogen om planten te besmetten. Zo besmetten de luizen no. 1 en 3 slechts drie maal, maar luis no. 5 elf maal. Het ligt voor de hand, aan te nemen, dat dit verschil in besmettingsvermogen samenhangt met verschillen in dosis virus, door de luizen uit de besmette plant opgenomen.

TABEL XI. Overbrenging van *Phaseolus-virus 1* stam W door *Myzus persicae* en *Aphis fabae* op Beka-bonen van verschillende leeftijd (Fig. 16). Iedere luis heeft vier maal op een toetsplant gezogen. Zuigtijden ten hoogste 15 sec.

TABLE XI. *Transmission of Phaseolus virus 1 strain W by Myzus persicae and Aphis fabae on Beka bean plants of different age (Fig. 16). Every aphid fed four times on a testplant. Infection and test feedings did not exceed 15 sec.*

Leeftijd toetsplanten	Prikken op proefplant	*Myzus persicae*												*Aphis fabae*											
Age of testplants	*Feeding punctures*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
15 dagen *15 days*	1	–[1]	+	+	–	–	+	+	–	+	–	+	+	–	+	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–
	2	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	+
	3	–	–	–	–	–	+	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	4	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
18 dagen *18 days*	1	+	–	+	+	–	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	–	+	–	–	–	+	+	–	–
	2	–	–	–	+	+	+	+	–	+	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	+	–	–
	3	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	4	–	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20 dagen *20 days*	1	–	+	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	+	–	+	–
	2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–	+	–	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	–
	3	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
	4	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–

[1]) – = geen infectie + = infectie [1]) – = *no infection* + = *infection*

TABEL XII. Besmetting van Beka-bonen met *Phaseolus-virus 1* stam RM door middel van *Myzus persicae* bij zuigtijden van maximaal 15 sec. op besmettingsbron en toetsplanten

TABLE XII. *Beka Beans infected with Phaseolus virus 1 strain RM by means of Myzus persicae. Infection and test feedings did not exceed 15 sec.*

No luis *No. of aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden in sec. op toetsplanten van 1–20 *Duration of test feedings on plants 1–20 in sec.*																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	15	8	**12**[1]	15	15	15	**15**	15	15	15	15	10	15	**15**	15	8	7	15	10	15	10
2	9	**15**	12	**15**	10	12	**12**	10	12	11	**12**	12	**9**	15	6	15	5	–	–	–	–
3	15	**12**	**15**	15	15	13	14	15	15	11	15	13	15	**11**	15	14	11	15	15	14	12
4	15	6	**15**	13	**12**	15	7	**13**	**15**	10	11	15	12	14	9	12	13	8	10	15	13
5	14	**12**	**15**	**11**	**10**	**10**	15	**15**	**15**	15	**3**	14	**15**	**7**	12	15	11	11	10	**15**	12
6	15	**15**	**15**	11	**15**	**11**	**13**	**12**	13	14	13	**15**	4	10	15	12	15	14	12	15	15
7	15	**15**	**13**	**15**	15	15	**13**	11	**11**	**15**	15	8	12	**10**	**15**	15	15	8	15	15	15

[1]) Vette cijfers = luizen hebben besmetting teweeggebracht (*bold figures = aphids caused infection*)

4.3.4. *Heeft de leeftijd van de besmettingsbron invloed op het vermogen van de luis het virus op te nemen?*

De proef, die in de vorige paragraaf werd besproken was blijkbaar onder zeer gunstige omstandigheden genomen. Toen nl. in Mei 1953 een soortgelijke proef, maar nu met Beka-planten, die ongeveer een maand eerder geïnoculeerd waren met PV1 stam W, als besmettingsbron werd uitgevoerd, bleven alle toetsplanten gezond. Ook in deze proef werden *M. persicae* en *A. fabae* beproefd; met elke soort een serie van 5 exemplaren.

Aangezien de besmettingsbron, die in deze proef werd gebruikt, ouder was dan die, waarvan in de vorige paragraaf sprake was, werd een mogelijke verklaring voor het mislukken gezocht in een te hoge leeftijd van het blad waar de luizen op gezogen hadden. Er zou dan moeten worden aangenomen, dat bladluizen het virus minder gemakkelijk opnemen naarmate het virusbevattende blad verouderde.

Ten einde hier nadere gegevens over te verkrijgen, werden van November 1953 tot Augustus 1954 enige reeksen proeven genomen. In iedere reeks was de besmettingsbron het eerste drietallige blad van een Beka-plant, die enkele weken voordat de reeks begon, met PV1 stam RM of stam W was geïnoculeerd. In een bepaalde reeks werd steeds hetzelfde drietallige blad als besmettingsbron gebruikt. Tabel XIII, blz. 42, geeft een overzicht van de data, waarop deze proeven werden uitgevoerd.

In de series 6, 7, 14 en 15 konden de bladluizen zowel op de besmettingsbron als op de toetsplanten zo lang zuigen als zij verkozen. Iedere luis evenwel slechts één keer op de besmettingsbron en vervolgens vier maal op een toetsplant, zoals beschreven in 4.2. Daarna werden zij de nacht over op een andere toetsplant gelocaliseerd. In de series 1 t/m 5 en 10 t/m 13 kreeg iedere luis een zuigperiode van hoogstens 15 sec. op de besmettingsbron en vervolgens vier maal een soortgelijke zuigtijd op de toetsplant, waarna zij werd gedood. Al deze proeven werden – op enkele uitzonderingen na – per datum met 12 bladluizen gedaan. In de vier series 8, 9, 16 en 17 konden de luizen één keer naar believen zuigen; daarna werden zij de nacht over op een toetsplant gelocaliseerd. Hierbij waren per datum omstreeks 24 exemplaren van elke soort betrokken.

De gegevens, die in deze proeven werden verkregen, behalve die welke op de series 8, 9, 16 en 17 betrekking hebben, zijn te vinden in Aanhangsel II. Ter wille van de overzichtelijkheid zijn de tussenpozen tussen twee zuigtijden niet opgenomen. Bovendien zijn ook geen gegevens vermeld aangaande de luizen, die in de proeven geen virus hebben overgebracht.

In Tabel XIV op blz. 43 zijn de aantallen luizen, die in iedere reeks per datum virus hebben overgebracht, uitgedrukt als percentage van de aantallen op die datum gebruikte luizen. Het valt op dat in de series 1 en 3 de latere pogingen, het virus over te brengen, geen succes hebben opgeleverd. In de andere proeven is een soortgelijk effect niet duidelijk. Wel komt het voor, dat op de laatste datum van de reeks de overbrenging geen succes boekte, maar dit gebeurde ook midden in sommige series.

Het is merkwaardig, dat een volkomen negatief resultaat van de overbrengingsproeven in de series 6 t/m 9 en 14 t/m 17 slechts één maal voorkomt, nl. in serie 9 bij de 3e proef. Maar dit betreft een proef met slechts drie luizen van de soort *A. fabae*. Waarschijnlijk moeten de goede resultaten in de series 6 t/m 9 en 14 t/m 17 worden toegeschreven aan de „vrije" zuigtijden van de

luizen op de besmettingsbron. Gezien de resultaten van BRADLEY & RIDEOUT (1953) kan men aannemen, dat een maximum zuigtijd van 15 sec., zoals in de andere series is toegepast, niet optimaal is voor de virusopneming. Deze auteurs vonden nl., dat een toeneming van de zuigtijd tot ongeveer 30 sec. op een met aardappel Y-virus besmette tabaksplant, tot betere resultaten leidde bij de overbrenging van dit virus door *Myzus persicae*, *Aphis abbreviata* en *Macrosiphum solanifolii*[1]).

Een algemene invloed van de leeftijd van een bonenblad, besmet met PV1, op het vermogen van *M. persicae* en *A. fabae* dit virus er uit op te nemen, is niet gebleken. Wel is er een tendens dat de stam W van PV1 minder gemakkelijk uit een ouder blad kan worden opgenomen, indien een maximale zuigtijd van 15 sec. in acht wordt genomen. In de proeven met „vrije" zuigtijden is hiervan echter niets gebleken. PV1 stam RM werd in alle series, ook in die waar de zuigtijd beperkt was tot hoogstens 15 sec., tot het einde toe op bevredigende wijze opgenomen. Het is niet uitgesloten dat hier van een verschil tussen de twee virusstammen sprake is; dit verschil zou dan echter alleen blijken bij een zuigtijd van minder dan 16 sec. Een positievere uitspraak hierover is echter pas mogelijk na verzameling van meer gegevens dienaangaande.

In de volgende paragraaf zal een analyse worden gegeven van de resultaten van de in Tabel XIII opgesomde proeven en zal ook het punt van de optimale zuigtijd ter sprake komen.

Aangaande de proeven met de ouder-wordende besmettingsbron kan nog worden opgemerkt dat, tegen het einde van de reeksen, de bladeren van de besmette planten, waar de luizen op zogen, meestal duidelijk aan het aftakelen waren. Vooral in de series 6 t/m 9 en 14 t/m 17 is hierop nauwkeurig gelet. De laatste maal, dat de bladeren in deze series als besmettingsbron werden gebruikt, waren zij nagenoeg geheel vergeeld; alleen langs de nerven was nog een uiterst smal randje groen aanwezig. De luizen maakten niet de indruk, dat zij op dit randje zogen. Toch was de overbrenging deze laatste maal nog bevredigend.

4.3.5. *Analyse van de overbrenging van Phaseolus-virus 1 door Myzus persicae Sulz. en Aphis fabae Scop.*

Zoals reeds is opgemerkt, was aan de zuigtijden der luizen in de series 6 t/m 9 en 14 t/m 17 (Tabel XIII) geen limiet gesteld. Wel werd er op toegezien, dat de dieren slechts één keer op de besmettingsbron zogen. Het was nu mogelijk te onderzoeken, welke zuigtijd op de besmettingsbron het gunstigst voor de overbrenging van de twee PV1-stammen was.

De zuigtijden op de besmette planten van alle luizen (ook van die, welke geen besmetting op de proefplanten teweeg hadden gebracht) werden in de volgende klassen ingedeeld: 1–15 sec., 16–30 sec., 31–60 sec., 61–120 sec. en 121 sec. en meer. Er werd nagegaan hoeveel maal elke zuigtijd voorkwam en welk gedeelte hiervan met een besmetting van toetsplanten correspondeerde. De gegevens, die aldus werden verkregen, zijn in Tabel XV, blz. 44, weergegeven.

Uit deze tabel kunnen verschillende gevolgtrekkingen worden gemaakt. *M.*

[1]) Volgens mondelinge mededeling van de Heer D. HILLE RIS LAMBERS moet *M. solanifolii: Macrosiphum euphorbiae* Thos. heten, en *A. abbreviata: Aphis nasturtii* Kltb., een luis die vroeger in Nederland als *Aphis rhamni* Fonsc. bekend stond.

TABEL XIII. Overzicht van de proeven naar aanleiding van de vraag of de leeftijd van de besmettingsbron invloed heeft op het resultaat van de overbrenging van *Phaseolus-virus 1* door *Myzus persicae* en *Aphis fabae*

TABLE XIII. *Review of the experiments concerning the effect of age of virus source on transmission results of Phaseolus virus 1 by Myzus persicae and Aphis fabae*

Serie *Series*	Virus	Besmettingsbron geïnoculeerd *Virus source inoculated*	Soort luis *Aphid species*	Overbrengingsproeven op *Transmission experiments on*						
				1	2	3	4	5	6	7
1	PV1-W	9 Nov. 1953	*M. persicae*	30 Nov.	3 Dec.	7 Dec.	10 Dec.	14 Dec.	17 Dec.	24 Dec.
2	Id.	24 Dec. 1953	*M. persicae*	13 Jan.	18 Jan.	25 Jan.	1 Febr.	8 Febr.	15 Febr.	–
3	Id.	24 Dec. 1953	*A. fabae*	12 Jan.	18 Jan.	25 Jan.	1 Febr.	8 Febr.	15 Febr.	–
4	Id.	15 Mrt 1954	*M. persicae*	1 Apr.	8 Apr.	15 Apr.	22 Apr.	29 Apr.	6 Mei	13 Mei
5	Id.	15 Mrt 1954	*A. fabae*	1 Apr.	8 Apr.	15 Apr.	22 Apr.	29 Apr.	6 Mei	13 Mei
6	Id.	22 Juni 1954	*M. persicae*	1 Juli	8 Juli	15 Juli	22 Juli	29 Juli	5 Aug.	–
7	Id.	22 Juni 1954	*A. fabae*	1 Juli	8 Juli	15 Juli	22 Juli	29 Juli	5 Aug.	–
8	Id.	22 Juni 1954	*M. persicae*	5 Juli	12 Juli	19 Juli	26 Juli	2 Aug.	9 Aug.	–
9	Id.	22 Juni 1954	*A. fabae*	5 Juli	12 Juli	19 Juli	26 Juli	2 Aug.	9 Aug.	–
10	PV1-RM	13 Jan. 1954	*M. persicae*	21 Jan.	28 Jan.	4 Febr.	11 Febr.	18 Febr.	26 Febr.	4 Mrt
11	Id.	13 Jan. 1954	*A. fabae*	22 Jan.	28 Jan.	4 Febr.	11 Febr.	19 Febr.	26 Febr.	4 Mrt
12	Id.	15 Mrt 1954	*M. persicae*	1 Apr.	8 Apr.	15 Apr.	22 Apr.	29 Apr.	6 Mei	13 Mei
13	Id.	15 Mrt 1954	*A. fabae*	1 Apr.	8 Apr.	15 Apr.	22 Apr.	29 Apr.	6 Mei	13 Mei
14	Id.	22 Juni 1954	*M. persicae*	2 Juli	9 Juli	16 Juli	23 Juli	30 Juli	6 Aug.	–
15	Id.	22 Juni 1954	*A. fabae*	2 Juli	9 Juli	–	23 Juli	30 Juli	6 Aug.	–
16	Id.	22 Juni 1954	*M. persicae*	6 Juli	13 Juli	20 Juli	27 Juli	3 Aug.	10 Aug.	–
17	Id.	22 Juni 1954	*A. fabae*	6 Juli	13 Juli	20 Juli	27 Juli	3 Aug.	–	–

TABEL XIV Overbrenging van de Phaseolus virus 1-stammen W en RM door *Myzus persicae* en *Aphis fabae* in de proeven, in Tabel XIII opgesomd

TABLE XIV *Transmission of the Phaseolus virus 1 strains W and RM by Myzus persicae and Aphis fabae in the experiments mentioned in Tabel XIII*

Serie *Series*	Virus	Soort luis *Aphid species*	Overbrenging in proeven op opeenvolgende data, in elke serie met dezelfde virusbron *Virus transmission in experiments on successive dates with the same virus source*						
			1	2	3	4	5	6	7
1	PV1-W	*M. persicae*	[1]) 6/13 = 0,46	6/12 = 0,50	2/12 = 0,17	1/12 = 0,08	0/12 = 0	0/12 = 0	0/12 = 0
2	Id.	*M. persicae*	8/12 = 0,67	4/12 = 0,33	3/12 = 0,25	5/13 = 0,38	2/12 = 0,17	0/12 = 0	–
3	Id.	*A. fabae*	3/12 = 0,25	5/12 = 0,42	3/12 = 0,25	0/12 = 0	0/12 = 0	0/12 = 0	–
4	Id.	*M. persicae*	8/12 = 0,67	5/12 = 0,42	6/12 = 0,50	1/12 = 0,08	0/12 = 0	1/12 = 0,08	0/12 = 0
5	Id.	*A. fabae*	4/12 = 0,33	0/12 = 0	0/12 = 0	2/12 = 0,17	1/12 = 0,08	2/12 = 0,17	0/11 = 0
6	Id.	*M. persicae*	3/8 = 0,38	10/16 = 0,63	7/9 = 0,78	8/12 = 0,67	9/12 = 0,75	6/12 = 0,50	–
7	Id.	*A. fabae*	1/8 = 0,13	6/12 = 0,50	6/12 = 0,50	4/12 = 0,33	7/12 = 0,58	4/12 = 0,33	–
8	Id.	*M. persicae*	17/24 = 0,71	9/24 = 0,37	18/24 = 0,75	19/30 = 0,63	14/24 = 0,58	13/24 = 0,54	–
9	Id.	*A. fabae*	9/22 = 0,41	6/24 = 0,25	0/3 = 0	2/18 = 0,11	3/7 = 0,43	1/8 = 0,13	–
10	PV1-RM	*M. persicae*	4/12 = 0,33	6/12 = 0,50	6/12 = 0,50	6/12 = 0,50	5/12 = 0,42	9/12 = 0,75	6/12 = 0,50
11	Id.	*A. fabae*	2/12 = 0,17	1/12 = 0,08	4/12 = 0,33	4/12 = 0,33	3/13 = 0,23	5/12 = 0,42	1/12 = 0,08
12	Id.	*M. persicae*	3/12 = 0,25	1/11 = 0,09	6/12 = 0,50	7/12 = 0,58	5/12 = 0,42	10/12 = 0,83	0/12 = 0
13	Id.	*A. fabae*	4/12 = 0,33	0/12 = 0	2/12 = 0,17	1/12 = 0,08	0/12 = 0	4/12 = 0,33	3/12 = 0,25
14	Id.	*M. persicae*	10/16 = 0,63	11/12 = 0,92	10/12 = 0,83	12/12 = 1,00	8/12 = 0,67	6/12 = 0,50	–
15	Id.	*A. fabae*	2/8 = 0,25	5/12 = 0,42	–	6/12 = 0,50	2/3 = 0,67	3/12 = 0,25	–
16	Id.	*M. persicae*	21/24 = 0,88	18/24 = 0,75	18/24 = 0,75	18/24 = 0,75	19/24 = 0,79	16/32 = 0,50	–
17	Id.	*A. fabae*	13/24 = 0,54	4/24 = 0,17	5/20 = 0,25	8/24 = 0,33	4/24 = 0,17	–	–

[1]) Aantal luizen, dat virus overbracht / aantal getoetste luizen

Number of aphids that caused infection / number of aphids tested

TABEL XV. De invloed van de lengte van de zuigtijd op de besmettingsbron op het resultaat van de overbrenging van *Phaseolus-virus 1* door *Myzus persicae* en *Aphis fabae*

TABLE XV. *The effect of duration of infection feedings on numbers and percentages of Myzus persicae and Aphis fabae that transmitted Phaseolus virus 1*

Serie *Series*	Virus	Zuigtijd op besmette plant in sec. *Infection feeding in sec.*					
		1–15	16–30	31–60	61–120	121–	
6	PV1-W	3/9[1]) = 0,33	28/44 = 0,64	7/10 = 0,70	3/3 = 1,00	1/2 = 0,50	*M. persicae*
8	Id.	11/31 = 0,35	60/92 = 0,65	17/25 = 0,68	2/2 = 1,00	–	
14	PV1-RM	6/18 = 0,33	35/38 = 0,92	12/15 = 0,80	3/4 = 0,75	1/1 = 1,00	
15	Id.	14/31 = 0,45	70/89 = 0,79	23/28 = 0,82	2/3 = 0,67	1/1 = 1,00	
	Totaal	34/89 = 0,38	193/263 = 0,73	59/78 = 0,76	10/12 = 0,83	3/4 = 0,75	299/446 = 0,67
7	PV1-W	1/16 = 0,06	23/42 = 0,55	4/7 = 0,57	0/1 = 0	0/1 = 0	*A. fabae*
9	Id.	1/16 = 0,06	19/60 = 0,32	1/6 = 0,17	–	–	
15	PV1-RM	4/17 = 0,24	10/24 = 0,42	4/6 = 0,67	–	–	
16	Id.	9/33 = 0,27	22/72 = 0,27	3/9 = 0,33	0/2 = 0	–	
	Totaal	15/82 = 0,18	74/198 = 0,37	12/28 = 0,43	0/3 = 0	0/1 = 0	101/312 = 0,32

[1]) Aantal luizen dat bij de aangegeven zuigtijden virus heeft opgenomen / totaal aantal luizen dat gedurende die tijden heeft gezogen
Number of aphids that acquired virus during feeding on source of infection / total number of aphids that fed during the time indicated

persicae blijkt PV1 veel beter te kunnen overbrengen dan *A. fabae*. Dit is dus een bevestiging van de indruk die enkele, in 2.2.3. (blz. 11) beschreven proefjes, reeds gaven. Voorts is op te merken dat de meeste luizen (zowel *M. persicae* als *A. fabae*) na een hongerperiode van 1–2 uur, een voorkeur hebben voor een zuigtijd van 16–30 sec. Ten slotte blijkt een zuigtijd die korter dan 15 sec. duurt, minder gunstig te zijn voor de opneming van het virus. Hoewel het aantal luizen, dat langer dan 60 sec. zoog betrekkelijk gering is, ziet het er naar uit dat deze zuigtijd nog niet ongunstig is voor de overbrenging van het virus door *M. persicae*.

Het is dus waarschijnlijk, dat de minder gunstige resultaten in de proefseries, waar een maximale zuigtijd van 15 sec. was gesteld, aan de korte duur van de zuigtijd op de besmette plant moet worden toegeschreven.

Op een soortgelijke wijze als geschied is voor de zuigtijden op de besmettingsbron, kunnen de zuigtijden op de proefplant in verschillende groepen worden ingedeeld, waarbij dan wordt bepaald welke keren infectie teweeg werd gebracht. Dit kan slechts geschieden met de gegevens uit de series 6, 7, 14 en 15, waarin de luizen vier maal op hun toetsplanten zogen; echter slechts met die gegevens, welke betrekking hebben op luizen, die virus hebben overgebracht. Tabel XVI (blz. 46) is het resultaat van een dergelijke rangschikking.

Ook uit deze cijfers blijkt een voorkeur van de luizen voor een zuigtijd van 16–30 sec. Bij *M. persicae* is – wanneer de langere zuigtijden, die naar verhouding weinig voorkwamen, buiten beschouwing worden gelaten – van een duidelijke invloed van de lengte van de zuigtijd (binnen een periode van een min.) op het resultaat van de overbrenging geen sprake. Men kan dus zeggen dat bij een zuigtijd van minder dan 16 sec. de voorwaarden voor besmetting even gunstig waren als bij een periode van 16–30 sec. zuigen. Bij *A. fabae* daarentegen, ziet het er naar uit dat een zuigtijd van 16–30 sec. gunstiger is dan een van minder dan 16 sec. De kans, dat *A. fabae* het virus op de juiste plaats in het blad deponeert, zou dus toenemen bij een zuigtijd tot een halve min. Over de invloed van een langere zuigtijd op de overbrenging kan niets worden gezegd, daar hier nauwelijks gegevens over zijn.

Rangschikking van de besmettingsresultaten is ook mogelijk door na te gaan hoeveel keren respectievelijk bij de eerste, tweede, derde en vierde prik op de proefplanten besmetting teweeg werd gebracht. Deze wijze van groepering werd ook met de gegevens van de series 1 t/m 6 en 10 t/m 13 uitgevoerd. In Tabel XVII (blz. 47) is het resultaat van een dergelijke rangschikking vastgelegd. Ook hier betreft het alleen gegevens van bladluizen, die het virus hebben overgebracht.

Ter verduidelijking van Tabel XVII dient opgemerkt te worden, dat het aantal bladluizen soms kleiner werd in de loop van het achtereenvolgens laten zuigen op de toetsplant, vanwege de weigering van enkele luizen opnieuw te prikken.

Bepaalde groepen van series zijn gesommeerd, nl. als virus en vector gelijk waren en bovendien de zuigtijd van de vector maximaal 15 sec. bedroeg. De series, waarin de luizen een „vrije" zuigtijd hadden, zijn steeds apart gehouden, daar zij niet gelijkwaardig aan de andere series zijn, zoals zojuist is gebleken.

Beschouwt men de cijfers, dan is in alle series, behalve in 6 en 14, een afnemend verloop in de besmetting naar de volgorde van de prikken op de toetsplant te bespeuren. Vooral bij de gegevens, die na sommering van proefreeksen

TABEL XVI. De invloed van de lengte van de zuigtijd op de toetsplant op het resultaat van de overbrenging van *Phaseolus-virus 1* door *Myzus persicae* en *Aphis fabae*

TABLE XVI. *The effect of duration of test feedings on numbers and percentages of Myzus persicae and Aphis fabae that transmitted Phaseolus virus 1*

Serie *Series*	Virus	Vector	Zuigtijd op toetsplant in sec. *Test-feeding time in sec.* 1–15	16–30	31–60	61–120	121
6	PV1-W	*M. persicae*	30/61 [1]) = 0,49	39/83 = 0,47	7/13 = 0,54	5/8 = 0,63	1/2 = 0,50
8	PV1-RM	*M. persicae*	27/59 = 0,46	53/125 = 0,42	12/21 = 0,57	4/10 = 0,40	2/2 = 1,00
7	PV1-W	*A. fabae*	8/26 = 0,31	35/70 = 0,50	1/7 = 0,14	–	1/1 = 1,00
9	PV1-RM	*A. fabae*	6/25 = 0,24	19/42 = 0,45	1/1 = 1,00	–	–

[1]) Aantal luizen dat infectie teweegbracht / aantal luizen dat gedurende de aangegeven tijden heeft gezogen *Number of aphids that caused infection / number of aphids that fed during the time indicated*

TABEL XVII. Overbrenging van *Phaseolus-virus 1* door *Myzus persicae* en *Aphis fabae*, die dit virus hadden opgenomen, in vier opeenvolgende prikken op toetsplanten

TABLE XVII. *Transmission of Phaseolus virus 1 by Myzus persicae and Aphis fabae which carried this virus in four successive test feeding punctures*

Serie *Series*	Virus	Vector	Volgorde der prikken op de toetsplanten *Successive test feeding punctures* 1	2	3	4
1	PV1-W	*M. persicae*	5/15 = 0,33	8/15 = 0,53	5/15 = 0,33	2/15 = 0,13
2	Id.	*M. persicae*	14/22 = 0,64	8/22 = 0,36	3/21 = 0,14	7/21 = 0,33
4	Id.	*M. persicae*	11/21 = 0,52	9/21 = 0,43	10/21 = 0,48	9/20 = 0,45
		Totaal	30/58 = 0,52	25/58 = 0,42	18/57 = 0,32	18/56 = 0,32
6	PV1-W	*M. persicae*	25/43 = 0,58	20/43 = 0,47	18/42 = 0,43	19/39 = 0,48
10	PV1-RM	*M. persicae*	14/42 = 0,33	24/42 = 0,57	20/42 = 0,48	14/42 = 0,33
12	Id.	*M. persicae*	18/32 = 0,56	13/32 = 0,41	11/32 = 0,34	10/32 = 0,31
		Totaal	32/74 = 0,43	37/74 = 0,50	31/74 = 0,42	24/74 = 0,32
14	PV1-RM	*M. persicae*	26/57 = 0,46	24/57 = 0,42	25/55 = 0,45	23/48 = 0,48
3	PV1-W	*A. fabae*	6/11 = 0,55	5/11 = 0,45	0/11 = 0	2/11 = 0,18
5	Id.	*A. fabae*	8/9 = 0,89	4/9 = 0,44	3/9 = 0,33	1/9 = 0,11
		Totaal	14/20 = 0,70	9/20 = 0,45	3/20 = 0,15	3/20 = 0,15
7	PV1-W	*A. fabae*	16/28 = 0,57	13/27 = 0,48	9/25 = 0,36	7/24 = 0,29
11	PV1-RM	*A. fabae*	16/20 = 0,80	5/20 = 0,25	1/9 = 0,05	3/19 = 0,16
13	Id.	*A. fabae*	7/14 = 0,50	3/14 = 0,21	2/14 = 0,14	6/13 = 0,46
		Totaal	23/34 = 0,68	8/34 = 0,24	3/23 = 0,13	9/32 = 0,28
15	PV1-RM	*A. fabae*	11/18 = 0,61	4/17 = 0,24	8/17 = 0,47	3/16 = 0,19

[1]) Aantal luizen dat infectie teweegbracht / aantal virusdragende luizen.
Number of aphids that caused virus / number of virus-carrying aphids

werden verkregen, is deze afneming in besmettingskansen op te merken[1]).

Alleen in de proefseries 6 en 14, waarin de vector *M. persicae* vrijelijk lang kon zuigen, kan het afnemen van de besmettingskansen in de opeenvolgende vier prikken, niet worden geconstateerd.

In Fig. 17 is voor *M. persicae* en *A. fabae* het verloop weergegeven van de besmettingskansen met de beide stammen van PV1 bij achtereenvolgende keren zuigen op de toetsplanten. De gegevens zijn ontleend aan de proeven, waarin de vector een maximale zuigtijd van 15 sec. werd gegund. De interpretatie van deze grafiekjes is deze, dat de beide luizensoorten bij de vierde prik op de toetsplant minder virus dragen dan bij de eerste prik, aangezien hun vermogen tot besmetten is gedaald. Merkwaardig is, dat bij *A. fabae* de afneming in het ver-

[1]) Ir L. C. A. KORSTEN, hoofd van de afdeling Wiskundige verwerking van proefveld-uitkomsten van het Instituut voor Rassenonderzoek te Wageningen heeft dit verloop in de besmettingskansen wiskundig getoetst met behulp van een bijzondere toepassing van de toets van WILCOXON. Schrijver wil ook op deze plaats hiervoor gaarne zijn dank betuigen.

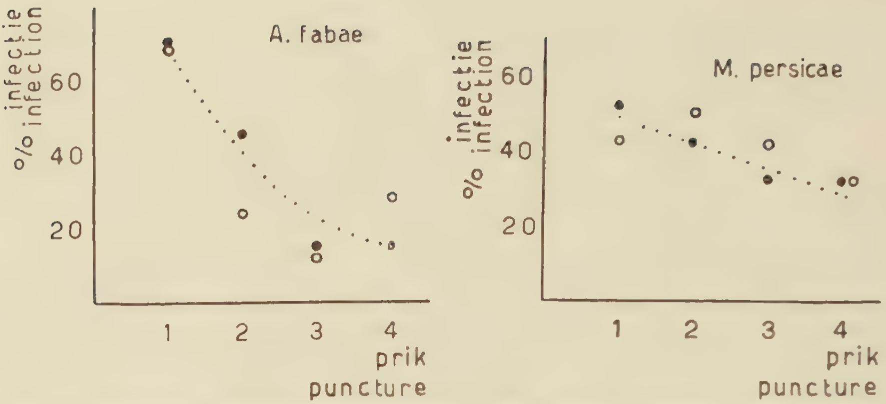


Fig. 17. Afneming in het vermogen om *Phaseolus-virus 1* over te brengen in opeenvolgende prikken op de toetstplant door bladluizen (*Myzus persicae* en *Aphis fabae*) die dit virus uit een besmette plant hebben opgenomen. Gegevens ontleend aan Tabel XVII (de totalen van de series 1, 2 en 4; 10 en 12; 3 en 5; 11 en 13). Zwart: stam W; wit: stam RM.

Graphs showing decrease in ability to transmit Phaseolus virus 1 in successive test-feeding punctures by aphids (Myzus persicae and Aphis fabae) which carried the virus. Data from Table XVII (Totals of series 1, 2 and 4; 10 and 12; 3 and 5; 11 and 13). Black: strain W; white: strain RM.

mogen om te besmetten sneller geschiedde dan bij *M. persicae*. Daarentegen was het aantal infecties, dat *A. fabae* bij de eerste prik teweeg bracht groter dan dat van *M. persicae*.[1])

Samenvattend heeft de hier uitgevoerde analyse der gegevens, afkomstig van de in Tabel XIII aangeduide proeven, de volgende resultaten opgeleverd.

1. *M. persicae* kan PV1 aanzienlijk beter overbrengen dan *A. fabae*.
2. Na een vastperiode van 1–2 uur vertonen beide luizensoorten op boon een voorkeur voor korte zuigtijden van 16–30 sec.
3. Voor het opnemen van PV1 uit een besmette plant is een zuigtijd van 1–15 sec. voor beide luizensoorten minder gunstig dan een zuigtijd van 16–30 sec.
4. Voor het overbrengen op de toetsplant is een zuigtijd van 1–15 sec. voor *M. persicae* even gunstig als een zuigtijd van 16–30 sec.; voor *A. fabae* is een zuigtijd van 16–30 sec. evenwel gunstiger.
5. In een reeks van vier opeenvolgende prikken op de toetsplant neemt het vermogen om besmetting teweeg te brengen voor beide vectoren af; dit is evenwel nog niet merkbaar bij *M. persicae*, die in een „vrije" zuigtijd virus heeft kunnen opnemen.
6. De afneming in het vermogen tot besmetting in opeenvolgende korte zuigtijden geschiedt bij *A. fabae* sneller dan bij *M. persicae*.
7. Het aantal infecties, dat PV1-dragende *A. fabae* bij de eerste prik op de toetsplant teweeg brengt is groter dan dat van *M. persicae*.

Aan de hand van de verkregen gegevens en met het oog op de resultaten van het onderzoek dat in 4.1. werd samengevat, kan een hypothese over het opnemen en de afgifte van het non-persistente PV1 worden opgesteld. Hierbij zij ten overvloede opgemerkt dat, wanneer in het volgende van „virus" sprake is, hiermee PV1 wordt bedoeld.

[1]) Ook dit heeft de wiskundige toets, die Ir Korsten toepaste, weerstaan.

Zoals reeds in de inleiding werd vermeld, kan men bij het verbazend snelle tempo waarmee de overbrenging van de non-persistente viren geschiedt, niet aannemen dat het opgenomen virus door de luis via de speekselklier weer zou worden afgegeven. Aan de andere kant is het echter moeilijk voor te stellen, gezien het eenrichtingsverkeer in het voedingskanaal, dat hierin opgenomen virus later weer rechtstreeks aan een andere plant zou kunnen worden afgestaan. Integendeel, men moet aannemen dat het virus, dat in het voedingskanaal is terecht gekomen, als smetstof is uitgeschakeld; het zal uiteindelijk in de maag terecht komen en daar onschadelijk worden gemaakt. Evenmin kan men aannemen, dat enig virushoudend sap in het speekselkanaal terecht zou komen.

Om een nadere verklaring te vinden voor het mechanisme, volgens hetwelk het virus wordt opgenomen, is het dienstig na te gaan wat er gebeurt als de luis gaat zuigen. Nadat de luis haar zuigsnuit op het blad heeft geplaatst, drukt zij haar stiletten in de epidermis. Hierbij wordt het rostrum door de bladoppervlakte tegen gehouden; de luis kan de stiletten slechts dieper in het blad brengen, door haar kop dieper te buigen. Volgens ROBERTS en BRADLEY brengt de luis haar stiletten inter- of intracellulair in de epidermis. Men kan zich voorstellen, dat de wijze waarop de stiletten worden ingestoken, reeds belangrijk is voor het al dan niet opnemen van virus, althans bij zeer korte zuigtijd. Immers, de kans dat virus wordt opgenomen is zeker groter, wanneer de luis in de cel zelf steekt en niet er tussendoor. Er is nl. geen reden om aan te nemen, dat de virusconcentratie normaliter intercellulair bijzonder hoog is.

Een volgend punt dat betekenis heeft, is of de luis wel of geen speeksel afscheidt. Volgens BRADLEY produceert een luis, als zij gedurende korte tijd haar stiletten in de epidermis brengt, geen of nauwelijks speeksel. Toch is het wel degelijk mogelijk, dat reeds een behoorlijke hoeveelheid speeksel wordt afgescheiden, zelfs voordat de stiletten in een epidermiscel zijn doorgedrongen. Zo werd bij *M. persicae* waargenomen, dat deze luis na een hongerperiode van enige uren, zeer gemakkelijk op een glasplaat de „zuighouding" aanneemt, waarbij de zuigsnuit op de plaat staat. Nu viel het in enkele gevallen op dat, wanneer de luis na enige seconden weer verder liep, op de plek waar de snuit had gerust een minuscuul druppeltje was achtergebleven.

Het is bekend dat luizen, die dieper dan de epidermis in de plant steken, zoveel speeksel kunnen afscheiden, dat zich een speekselschede vormt (ROBERTS). De resultaten van BRADLEY tonen aan dat een luis, die dieper dan de epidermis steekt, nagenoeg geen virus kan opnemen. De storende factor hierbij kan de zich vormende speekselschede zijn, zoals BRADLEY zelf suggereert. Doch zonder verhard te zijn zou het speeksel reeds een ongunstige invloed kunnen hebben op het vermogen van de luis tot het opnemen van virus.

Men zou zich dit opnemen als een soort van hechting aan het oppervlak van de stiletten kunnen voorstellen. Het is denkbaar dat de oppervlakte van de stiletten een bepaalde structuur heeft, die van luizensoort tot luizensoort verschilt en die de binding van het virus bepaalt.

Belangrijke voorwaarden voor de binding van virus aan het oppervlak der stiletten zouden zijn: 1. de luis moet haar stiletten daar in de cel brengen waar virusdeeltjes aanwezig zijn in een toestand, die toelaat dat zij zich hechten aan dit oppervlak. 2. De storende invloed van speeksel moet afwezig zijn.

De binding van virus zou zodanig zijn, dat bij terugtrekken van de stiletten uit de cel, de virusdeeltjes niet op eenvoudige wijze kunnen worden afgestreken.

Als het virus aan de stiletten is opgenomen, kan het aan een andere plant worden afgestaan, indien de luis op daartoe gunstige wijze (dit is: intracellulair) steekt. Dan kan het virus door het sap in een of ander proces van de stiletten worden afgewassen. Duurt dit afwas-proces lang, dan zal de opgenomen virusvoorraad langzaam afnemen en dus kan de virusdragende luis meer dan een plant in successie besmetten. Prikt de luis evenwel intercellulair dan kan het virus niet worden afgewassen, of het komt niet terecht waar het behoorde te zijn om infectie te beginnen. Het resultaat is, dat er planten in de rij van zuigtijden niet worden besmet.

5. ZUIVERING VAN DE BONENVIREN TEN BEHOEVE VAN ELECTRONENMICROSCOPIE[1])

5.1. Inleiding

Electronenmicroscopie van viren heeft meestal alleen goede resultaten opgeleverd in gevallen, waar gezuiverde viruspreparaten werden onderzocht. Deze werden dan bijv. verkregen door middel van uitzouting met ammoniumsulfaat uit het vooraf, door centrifugering bij laag toerental, van chloroplasten en andere vaste bestanddelen bevrijde sap. Ook het gebruik van de ultracentrifuge heeft tot voldoend zuivere viruspreparaten geleid, waarvan goede electronenfoto's konden worden vervaardigd.

Wanneer men viren onderzoekt, die een hoge mate van resistentie tegen verschillende invloeden bezitten, is het niet bezwaarlijk, dat er na het uitpersen van de besmette planten langere tijd verstrijkt, eer de zuivering is voltooid, aangezien de besmettelijkheid van het betreffende virus toch weinig achteruit gaat. Men kan dan met behulp van het infectie-experiment aantonen, dat het virus in het gezuiverde preparaat nog voorhanden is. Dit geldt in hoge mate voor de viren, die alleen met sap kunnen worden overgebracht, zoals tabaksmozaiekvirus, tabaksnecroseviren, bushy stunt-virus van de tomaat en aardappel X-virus.

De labiele viren, dat wil zeggen de viren die hun infectievermogen binnen betrekkelijk korte tijd in het perssap van de zieke plant verliezen, zijn echter moeilijker op de geschetste wijze in zuivere toestand te verkrijgen. Het betreft hier voornamelijk de groep van viren, die zowel met sap als door middel van bladluizen kunnen worden overgebracht. Deze groep vormt, zoals reeds eerder werd vermeld, een belangrijk deel van de thans bekende plantenviren.

Het is begrijpelijk dat men getracht heeft methoden te ontwikkelen, die sneller leiden tot het doel: het verkrijgen van viren in een milieu, dat betrekkelijk weinig bijbestanddelen bevat. THUNG (1948) en JOHNSON (1951) hebben daartoe gebruik gemaakt van bloedingsvochten, die uit verwonde plantendelen te voorschijn treden. De eerste auteur sneed stengels van gezonde en zieke planten door, plaatste deze met pot en al in bakken met lauw water en verkreeg aldus een uit het snijvlak te voorschijn komend waterhelder vocht, dat direct op de preparaathouders van de electronenmicroscoop kon worden gebracht. JOHNSON be-

[1]) Schrijver wil ook hier zijn grote dank betuigen aan Mejuffrouw C. VAN DER SCHEER, phys. dra, voor het vele werk, dat zij met de electronenmicroscoop verrichtte en aan Ir H. W. J. RAGETLI voor zijn buitengewone hulp en vele waardevolle suggesties bij het chromatografische onderzoek.

vestigde afgesneden stengels of bladeren op een bepaalde manier aan de waterleiding. Werden vervolgens de bladeren doorgesneden en de druk van de waterleiding aangebracht, dan vertoonden zich spoedig heldere druppeltjes op de plekken, waar de nerven waren doorgesneden. Ook in dit vocht kon met de electronenmicroscoop de aanwezigheid van bijzondere deeltjes op bevredigende wijze worden aangetoond.

Uit onderzoekingen van GUTHRIE & FULTON (1954) is het evenwel duidelijk geworden, dat men met de interpretatie van opnamen van aldus verkregen bloedingsvocht zeer voorzichtig moet zijn. Zij vonden namelijk draadvormige deeltjes in met behulp van waterdruk verkregen bloedingsvochten van talrijke aardappelrassen die, volgens hun onderzoek, als virusvrij moeten worden beschouwd. Soortgelijke deeltjes vonden zij eveneens in bloedingsvocht van jonge, uit zaad opgekweekte aardappelplantjes die, gezien hun herkomst en de resultaten van een desbetreffend onderzoek, vrij van virus geacht konden worden. De deeltjes waren van hetzelfde type als die, welke voorkwamen in het vocht van aardappelplanten, besmet met aardappel X-virus. Ook het bloedingsvocht, dat onder druk uit jonge, gezonde *Phaseolus vulgaris*-planten (ras Pinto) werd verkregen, bleek draadvormige deeltjes te bevatten.

BAWDEN & NIXON (1951) beschreven een eenvoudige werkwijze om electronenmicroscopische opnamen van plantenviren te maken. Zij gingen uit van bladeren die duidelijke ziekteverschijnselen vertoonden, verwijderden hieruit de grootste nerven en bestrooiden het overblijvende deel met Na_2HPO_4. De bladeren werden daarna in een mortier fijn gemaakt en het sap door doek uitgeperst. Na enige uren bewaring bij –10° C werd het sap ontdooid en 10 min. bij 7000 t.p.m. gecentrifugeerd. Van de bovenstaande vloeistof werden preparaten voor electronenmicroscopie gemaakt.

De methode van BAWDEN & NIXON heeft echter, voor zover bekend, weinig navolging gevonden. Dit is waarschijnlijk een gevolg van het feit, dat de zuiverheid van de aldus verkregen preparaten te wensen overlaat.

In het, in dit hoofdstuk te beschrijven, onderzoek is gebruik gemaakt van de hierboven aangehaalde methode van THUNG ter winning van bloedingssappen van zieke en gezonde planten. Voorts werd sap, dat bij betrekkelijk laag toerental helder was gecentrifugeerd, in de ultracentrifuge gedurende een uur bij ong. 37.000 t.p.m. gedraaid en van de sedimenten, opgenomen in water, werden preparaten voor electronenmicroscopisch onderzoek gemaakt. Ten slotte is de chromatografie op filtreerpapier beproefd, volgens de methode van RAGETLI & VAN DER WANT (in druk).

Een moeilijkheid van het werken met PV1 en PV2 is, dat zij dikwijls tijdens het centrifugeren van het perssap bij laag toerental, tezamen met de vaste bestanddelen, worden neergeslagen. Aangaande PV1 hebben BEEMSTER & VAN DER WANT (1951) hier reeds op gewezen. Ook bij tabak, besmet met aardappel Y-virus (CREMER, 1951) en komkommer en tabak besmet met komkommermozaiekvirus (SILL, BURGER, STAHMANN & WALKER, 1952; NOORDAM, 1952) kon worden aangetoond dat deze viren de neiging hebben tijdens het centrifugeren bij laag toerental met chloroplasten en andere grove delen te sedimenteren.

5.2. Resultaten van het onderzoek

Er werd gebruik gemaakt van bonenplanten, respectievelijk besmet met WKV en met de stammen van PV1 en PV2. Het meest deden de planten van het

ras Beka dienst, doch in proeven met de twee stammen van PV2 werd ook het ras Servus gebruikt. De besmette plantendelen werden eerst in een mortier fijngewreven en het sap werd vervolgens met behulp van een handpersje door kaasdoek uitgeperst. Grotere hoeveelheden materiaal werden in een vleesmolen fijngemalen en daarna in een hydraulische pers uitgeperst. Bij de inoculaties werd steeds van fijn carborundumpoeder gebruik gemaakt.

5.2.1. *Invloed van centrifugeren op de besmettelijkheid van sap*

In het reeds eerder genoemde artikel van Beemster & Van der Want (1951) worden gegevens verstrekt aangaande de invloed van centrifugeren van het sap van Beka-planten, besmet met PV1, gedurende 20 min. bij 12.000 t.p.m. Hun onderzoek had betrekking op de stam van dit virus, die hier als stam RM wordt aangeduid. Hij werd sedert jaren met sap of door middel van bladluizen van plant op plant overgebracht en aldus in stand gehouden. In deze tijd zijn geen veranderingen in de aard van de door deze stam teweeggebrachte ziektesymptomen waargenomen. De bovenstaande vloeistof bleek geen besmettingsvermogen te bezitten; daarentegen had het sediment, in water gesuspendeerd, dezelfde infectieuziteit als het oorspronkelijke sap. In deze proef komt wel zeer duidelijk de invloed van centrifugeren op de besmettelijkheid tot uiting. Later genomen proeven gaven echter niet steeds zo'n absoluut effect van het centrifugeren te zien. In deze proeven kon niet worden vastgesteld, dat de uitslag van het centrifugeren op enige (eenvoudige) wijze verband hield met het seizoen of de leeftijd van de plant.

Wat hier met betrekking tot het sap van planten, besmet met PV1 is opgemerkt, geldt evenzeer voor het sap van planten, besmet met PV2. De besmettelijkheid van sap van bonenplanten, geïnfecteerd met WKV, was daarentegen in verscheidene desbetreffende proeven na centrifugeren niet merkbaar minder dan voor deze behandeling. Dit werd bepaald in een verdunningsproef. Toch moet ook hier een deel van het virus gesedimenteerd zijn, aangezien de sedimenten, opgenomen in water nog in een behoorlijke verdunning besmettelijk waren.

Ook Noordam (1952), die in zijn onderzoekingen over *Cucumis-virus 1* stam Chrys. het willekeurige gedrag van dit virus bij centrifugering ontmoette, kan hier geen verklaring voor vinden. Een nauwkeurige analyse van dit verschijnsel zal wellicht slechts mogelijk zijn als men de omstandigheden, waaronder de met het virus besmette planten worden geteeld, volledig in de hand heeft. Eer dit probleem echter is opgelost, heeft elke poging om dergelijke viren te zuiveren een grote onzekerheid, daar men niet weet of het virus in voldoende mate aanwezig is in het helder gecentrifugeerde sap, dat doorgaans als uitgangsmateriaal voor verdere viruszuivering wordt gebruikt. In het hierna geschetste onderzoek is deze onzekerheid aanvankelijk voor lief genomen. Later is getracht haar te ondervangen door gebruik te maken van niet gecentrifugeerd sap bij een papierchromatografische scheiding.

5.2.2. *Sedimentatie van de Phaseolus-viren 1 en 2 in de ultracentrifuge*

Sap van bonenplanten, besmet met de stammen RM en W van PV1 en van de stammen TN en D van PV2, werd zoveel mogelijk van grove delen bevrijd door centrifugeren bij 12.000 t.p.m. gedurende 45 min. Hetzelfde geschiedde

met sap van gezonde planten, die van gelijke leeftijd waren als de besmette planten. Ultracentrifugebuisjes van ong. 50 ml inhoud werden vervolgens met de respectievelijke vloeistoffen gevuld en deze werden 1 uur bij 37.020 t.p.m. gecentrifugeerd. De hierbij verkregen heldere vloeistoffen werden op Beka-planten geïnoculeerd en bleken daarbij geen infectievermogen meer te bezitten. Het groenachtige sediment in elk buisje werd in 10 ml gedestilleerd water opgenomen. De neerslagen lieten zich niet gemakkelijk suspenderen, doch moesten eerst met een glazen staafje tegen de buiswand worden uitgesmeerd, waarna zij zich gemakkelijker in het water verdeelden. De aldus verkregen vloeistoffen waren troebel en werden na 30 min. centrifugeren bij 12.000 t.p.m. vrijwel helder. Deze heldere vloeistoffen werden op bonenplanten geïnoculeerd, terwijl er tevens preparaatjes voor electronenmicroscopie van werden gemaakt. Deze laatste werden vervaardigd door met een platina-oogje druppels van de onverdunde vloeistoffen en van de verdunningen 1:10 met gedestilleerd water, op het formvar-vlies van de preparaathouders te brengen. Deze druppels werden na enige tijd afgevloeid, waarna de preparaathouders verder aan de lucht droogden. De preparaten werden met palladium geschaduwd en daarna electronenmicroscopisch onderzocht.

Uit de inoculatieproeven bleek, dat de genoemde viren in de ultracentrifugesedimenten aanwezig waren. Met de electronenmicroscoop konden echter geen verschillen tussen de preparaten van de met virus besmette planten en die van de gezonde planten worden waargenomen. Hoewel de viren door het ultracentrifugeren geconcentreerd moeten zijn, sloegen toch blijkbaar zoveel nevenbestanddelen uit het sap mee neer, dat er electronenmicroscopisch geen verschil tussen het ultracentrifuge-sediment van de sappen der zieke en gezonde planten meer viel waar te nemen.

Voor deze opvatting pleit ook de overeenstemming tussen de sedimentatiediagrammen van de gesuspendeerde ultracentrifuge-neerslagen uit de sappen van met PV1 stam RM besmette bonen en van gezonde bonen. Er werd geen component waargenomen in het sedimentatiediagram van het virusbevattende materiaal, die ontbrak in het diagram van de vloeistof, afkomstig van gezonde planten. Het is denkbaar, dat de concentratie te gering was voor registratie van het virus in het diagram, maar ook is het mogelijk dat het virus gelijkelijk sedimenteerde met een der in betrekkelijk hoge concentratie aanwezige nevenbestanddelen.

Daar het gebruik van de ultracentrifuge als hulpmiddel bij de vervaardiging van electronenmicroscopische preparaten hier zonder voorafgaande fractionering van de virushoudende concentraten geen resultaten beloofde, werden andere wegen gezocht.

5.2.3. *Gebruik van bloedingssap voor electronenmicroscopisch onderzoek*

Voor de winning van bloedingsvocht deden Beka-planten, gegroeid in watercultuur, dienst. De cultuurvloeistof was een oplossing volgens Knop, waaraan sporen-elementen waren toegevoegd. Wanneer deze vloeistof dagelijks een uur werd geaëreerd en de vloeistof zelf iedere week werd ververst, bleken de bonenplanten bijzonder goed te groeien. Ter winning van het bloedingsvocht werden de planten onder de zaadlobben afgesneden, waarna de cultuurvloeistof door water met een temperatuur van 40°–45°C werd vervangen. Het bloedingssap werd verzameld in een capillair, waarvan het uiteinde zich op geringe afstand

boven de wond bevond. De vochtdruppels werden direct na het tevoorschijn komen opgezogen. Na enige uren was voldoende vocht geproduceerd om er preparaten voor electronenmicroscopie van te maken en er tevens inoculaties mee te verrichten. Op de geschetste wijze werden bloedingssappen gewonnen van Beka-planten, die ongeveer een maand tevoren respectievelijk met de PV1- en PV2-stammen en met WKV waren geïnoculeerd. Deze vloeistoffen werden onverdund en in de verdunning 1:10 op preparaathouders voor de electronenmicroscoop gebracht. Bovendien werden met de onverdunde vochten jonge Beka-planten geïnoculeerd. Uit deze inoculatieproef bleek, dat alleen het bloedingssap van bonenplanten, besmet met WKV infectieus was.

De proef werd herhaald met dit verschil, dat het bloedingsvocht thans bij de PV1- en PV2-stammen een week en bij WKV twee weken na de inoculatie van de planten werd gewonnen. De bloedingsvochten, zowel als de perssappen van de bladeren en de wortels van de planten, die de bloedingssappen leverden, werden op Beka-planten geïnoculeerd. Uit de proeven met sap bleek, dat alle viren, niet alleen in de bladeren, maar ook in de wortels aanwezig waren. Het resultaat van de inoculaties met de verschillende bloedingssappen was evenwel gelijk aan dat van de eerste proef. Opnieuw werden nl. alleen de planten, geïnoculeerd met het bloedingssap van de met WKV-besmette bonen, ziek.

Het electronenmicroscopisch onderzoek van de verschillende bloedingsvochten leverde een resultaat op, dat volkomen met de zojuist geschetste inoculatieproeven overeenstemde. Er werden namelijk alleen in het vocht van de planten, besmet met WKV, deeltjes waargenomen, die ontbraken in de preparaten van het vocht der gezonde planten. Deze deeltjes zijn gelijk van vorm en grootte aan die voorkomend in Fig. 19, een electronenmicroscopische opname van een preparaat, verkregen na toepassing van de hierna te noemen papierchromatografische scheidingsmethode op het sap van bonen, besmet met WKV.

Uit de resultaten van de inoculatieproeven blijkt opnieuw een merkwaardig verschil tussen WKV aan de ene en de PV1- en PV2-stammen aan de andere kant. Hoewel alle viren door de gehele plant voorkwamen, kon alleen WKV in het bloedingssap worden aangetoond, terwijl zoals reeds gezegd, dit bloedingssap tevens gekenmerkt was door de aanwezigheid van draadvormige deeltjes.

5.2.4. *Toepassing van papierchromatografie voor de zuivering van de bonenviren*

Hierbij werd gebruik gemaakt van de ervaringen, die waren opgedaan bij het papierchromatografisch onderzoek van gezuiverde preparaten van tabaksmozaiekvirus en van sap van tabaksmozaiekzieke tabaksplanten (Ragetli & Van der Want, in druk). De in het aangehaalde artikel beschreven methode is gebaseerd op de overweging, dat bij chromatografie zeer kleine verschillen in moleculaire bouw van verwante stoffen vaak voldoende zijn om mengsels van deze stoffen te scheiden. Bovendien worden bij toepassing van de chromatografische scheiding niet alleen verschillen in molecuulgrootte en dichtheid, zoals bij het gebruik van de ultracentrifuge, maar ook verschillen in oplosbaarheid en in adsorptieve eigenschappen benut. Ten slotte biedt de chromatografie alle voordelen van een continu proces, terwijl deze werkwijze bij toepassing van water en andere onschadelijke elutie-middelen, zeer zachtaardig ten opzichte van het virus is.

Aanvankelijk werd chromatografie toegepast op, bij 12.000 t.p.m. gedurende

½ uur, gecentrifugeerd sap van zieke en gezonde planten. Aan 9 volumendelen van het sap werd direct na het uitpersen der bladeren 1 volumendeel van een 1% waterige KCN-oplossing toegevoegd. Dit werd gedaan, omdat gebleken was dat hiermee de bruinkleuring van het sap kon worden voorkomen.

Chromatografie van het aldus gecentrifugeerde sap van planten, respectievelijk besmet met WKV en de stammen van PV1, leidde tot de vervaardiging van preparaten voor electronenmicroscopie, waarin typische verschillen met op overeenkomstige wijze vervaardigde preparaten van het sap van gezonde planten werden waargenomen. Chromatografie van helder gecentrifugeerd sap van planten, besmet met de stammen van PV2 leverde geen resultaten op als gevolg van het reeds eerder gesignaleerde willekeurige gedrag van het virus bij centrifugeren. Inoculatieproeven toonden nl. aan, dat het virus in deze gevallen uit de bovenstaande vloeistof was verdwenen.

Om deze moeilijkheid te ondervangen werd allereerst ongecentrifugeerd, niet verdund sap gechromatografeerd. Electronenmicroscopisch onderzoek toonde evenwel aan, dat de fractionering der verschillende sapcomponenten tijdens het chromatograferen onvolledig was, vermoedelijk als gevolg van een overlading van het papierchromatogram. Daarom werden nieuwe chromatogrammen gemaakt, thans met verdund sap. Aan het sap van planten besmet met PV2 stam TN werden per volumendeel twee volumendelen, aan dat van planten besmet met stam D een volumendeel gedestilleerd water toegevoegd. Deze verdunningen werden vervolgens gemengd met 1 deel 1% KCN-oplossing per 9 delen vloeistof.

In electronenmicroscoop-preparaten, vervaardigd na fractionering van het verdunde sap, werden nu ophopingen van draadvormige deeltjes waargenomen, die niet voorkwamen in overeenkomstige fracties van het sap van gezonde planten.

Chromatografie werd bedreven op stroken Whatman no. 1 filtreerpapier van 6 cm breed en 56 cm lang. In de dikomlijnde rechthoek (de zgn. oorsprong) aan het boveneinde van de strook (Fig. 18a) werd 0,09 ml van de te chromatograferen sappen aangebracht. De strook werd vervolgens langs de lijn CD tussen twee glasplaatjes geklemd en deze werden geplaatst in porceleinen schaaltjes. Het aldus bevestigde chromatogram werd overgebracht in een met waterdamp verzadigde ruimte, waarin de lucht vervangen was door stikstof. Dit laatste diende om de eventueel ongunstige invloed van de zuurstof uit de lucht op de virusactiviteit te ontgaan. Vervolgens werd gedestilleerd water in het porceleinen schaaltje gedaan. Dit water steeg tussen de glasplaatjes op en werd in het papier opgezogen.

Van elk te onderzoeken sap werden twee chromatogrammen vervaardigd, waarbij er voor werd gezorgd dat het eerste ongeveer drie kwartier eerder gereed kwam dan het tweede. Indien het vloeistoffront in het eerste chromatogram de in Fig. 18a met „finish" aangeduide lijn bereikte, werd het chromatogram in 20 min. bij ongeveer 55°C gedroogd en vervolgens langs de lijn AB door midden geknipt, waarna de linker helft in ultraviolet licht van omstreeks 265mμ werd gefotografeerd. Uit de eerder aangehaalde publicatie was nl. gebleken, dat op deze wijze sterk ultraviolet absorberende stoffen op het chromatogram konden worden gelocaliseerd (Fig. 18b, 1, 2 en 3).

Aan de hand van de aldus gelocaliseerde sterk ultraviolet absorberende stoffen werd het tweede chromatogram, zodra het vloeistoffront eveneens de

finish had bereikt, in natte toestand in stroken geknipt. Ter vergemakkelijking was het papier vooraf met potlood door evenwijdige lijnen verdeeld in een aantal gelijke delen, genummerd 1 t/m 22. Deze stroken werden met kleine volumina gedestilleerd water uitgetrokken. De verkregen extracten werden ter verwijdering van cellulosevezels, over een hard papierfilter afgezogen. Van de meestal waterheldere filtraten werden vervolgens preparaten voor electronenmicroscopie vervaardigd. Bovendien werden zij op proefplanten op hun infectievermogen getoetst.

De in Fig. 18b weergegeven opnamen van in ultraviolet gefotografeerde helften van chromatogrammen hebben betrekking op sap van met PV2 stam TN besmette planten. No. 1 betreft niet gecentrifugeerd sap, no. 2 sap, verdund met twee volumendelen gedestilleerd water, en no. 3 onverdund, gecentrifugeerd sap.

Behalve het kenmerkende verschil aan de oorsprong, als gevolg van de aanwezigheid van chloroplasten en andere grove sapbestanddelen die sterk ultraviolet absorberen, valt er een duidelijk verschil te constateren in de mate waarin de ultraviolet-absorberende bestanddelen in de verschillende chromatogrammen gescheiden werden. In no. 1 komt de reeds genoemde overlading tot uiting in het zonder volledige scheiding in elkaar overlopen van genoemde bestanddelen, terwijl deze in no. 3 door duidelijke niet absorberende gebieden worden onderbroken. No. 2 vertoont een met no. 3 vergelijkbare scheiding, hoewel dit in de afbeelding niet voldoende tot uiting komt. Ten slotte kan nog worden geconstateerd, dat de loopsnelheid van de verschillende componenten in de afgebeelde chromatogrammen van links naar rechts toeneemt.

Overeenkomstige verschillen werden waargenomen in chromatogrammen van wel en niet verdund, resp. gecentrifugeerd sap van gezonde planten en van planten besmet met de andere viren.

Van extracten uit hieronder te noemen delen van een aantal chromatogrammen, betrekking hebbend op gecentrifugeerd sap van planten besmet met WKV, met PV1 stam RM en met PV1 stam W, zijn preparaten vervaardigd waarvan de electronenmicroscoop-opnamen in de Fig. 19, 20 en 21 zijn weergegeven. De Fig. 22, 23 en 24 hebben betrekking op extracten uit delen van chromatogrammen van ongecentrifugeerde sappen van gezonde planten en van planten besmet met de PV2-stammen. Zoals reeds is medegedeeld waren de sappen van de planten met de PV2-stammen verdund.

Fig. 19 heeft betrekking op een preparaat van het extract uit de strook 10–10,5 (Fig. 18a) van een chromatogram van gecentrifugeerd sap van Beka met WKV. Deze strook werd met 1 ml H_2O geëxtraheerd. Na inoculatie van vier Beka-planten met dit extract werden alle ziek.

Fig. 20 heeft betrekking op een preparaat van het extract uit de strook 10,5–12 van een chromatogram van gecentrifugeerd sap van Beka met PV1 stam RM. Deze strook werd met 1 ml H_2O geëxtraheerd. Na inoculatie van 4 Beka-planten met dit extract werden alle ziek.

Fig. 21 heeft betrekking op een preparaat van het extract uit de strook 5,5–7 van een chromatogram van gecentrifugeerd sap van Beka met PV1 stam W. Deze strook werd met 1 ml H_2O geëxtraheerd. Na inoculatie van 4 Beka-planten met dit extract werden alle ziek.

Fig. 23 heeft betrekking op een preparaat van het extract uit de strook 5–6,5 van een chromatogram van niet gecentrifugeerd, verdund sap van Servus met

PV2 stam TN. Deze strook werd met 1 ml H_2O geëxtraheerd. Na inoculatie van 3 Bekaplanten werd er een ziek[1]).

Fig. 24 heeft betrekking op een preparaat van het extract uit de strook 10–11,5 van een chromatogram van niet gecentrifugeerd, verdund sap van Beka met PV2 stam D. Deze strook werd met 1 ml H_2O geëxtraheerd. Na inoculatie van 3 Beka-planten werden alle ziek.

De electronenmicroscooppreparaten van de bovengenoemde stroken werden steeds vergeleken met die van extracten uit overeenkomstige zones van chromatogrammen van in leeftijd overeenkomende gezonde planten.

Fig. 22 geeft een beeld van het materiaal, dat geëxtraheerd werd uit strook 8–12 van een chromatogram van niet gecentrifugeerd sap van gezonde Beka. Deze strook werd met 2 ml water geëxtraheerd.

Bij vergelijking van de Fig. 19, 20 ,21 en 22 blijkt, dat tegen een gelijkmatige fijn-korrelige achtergrond in de preparaten van het sap der zieke planten draadvormige deeltjes voorkomen, die in het sap der gezonde bonen ontbreken. De draadvormige deeltjes, die voorkomen in het sap van de planten besmet met de PV1-stammen, hebben een sterkere neiging tot aggregatie dan de deeltjes in het sap van de planten besmet met WKV. De eerstgenoemde deeltjes kunnen zeer lang worden en zich sterk om elkaar heen slingeren, als gevolg waarvan kluwenachtige ophopingen voorkomen. Wanneer men aanneemt, dat de draadvormige deeltjes inderdaad het virus voorstellen (een absoluut bewijs, dat de deeltjes werkelijk virusactiviteit hebben is niet te leveren) dan zou het sedimenteren van de PV1-stammen tijdens centrifugeren bij betrekkelijk laag toerental wellicht aan deze sterke aggregaatvorming kunnen worden toegeschreven. Voorts viel het bij electronenmicroscopie van vele preparaten van de PV1-stammen op, dat vaak aan de draadjes amorfe bijbestanddelen kleefden.

Fig. 21 laat zien, dat de deeltjes (in dit geval uit het sap van planten, besmet met PV1-stam W) geheel of ten dele onder een laag van zeer fijn materiaal kunnen schuil gaan. In dit geval zijn de contouren der deeltjes nog duidelijk waarneembaar, doch men kan zich voorstellen, dat een dikkere laag van dit bijmengsel de draadvormige deeltjes geheel doet verdwijnen.

Bij beschouwing van de Fig. 23 en 24, die betrekking hebben op het sap van planten, respectievelijk besmet met PV2 stam TN en PV2 stam D, komt het effect van sterke aggregatie van draadvormige deeltjes tot in elkaar gedraaide strengen bijzonder sterk tot uiting. Verscheidene van deze strengen zijn als het ware ten dele ontward en geven aldus gedeelten van dunne, mogelijk enkelvoudige draden te zien (zie de witte pijltjes). Een tendens tot de vorming van strengen is, zij het in bescheidener mate, reeds waarneembaar bij het preparaat van gechromatografeerd sap van planten besmet met PV1 stam RM (Fig. 20). Bovendien blijkt uit de afbeeldingen, betrekking hebbend op het PV2-houdend materiaal, dat de ophopingen der samengebundelde draadvormige deeltjes een sterke neiging hebben zich te associëren met amorfe bijbestanddelen van het sap. Dergelijke associaties van strengen draadvormige deeltjes en amorfe aanhechtsels kwamen regelmatig verspreid over de oppervlakte der preparaten voor. Opmerkelijk hierbij was, dat de bedoelde amorfe substantie zelden of nooit los van de ophopingen van draadvormige deeltjes werden waargenomen. Men krijgt de indruk, dat de afgebeelde structuren ontstaan zijn als gevolg van

[1]) Waarschijnlijk speelt in dit geval de verdunning van het oorspronkelijke sap een rol.

het aan elkaar hechten van gedispergeerde deeltjes tijdens het verdampen van het water op de preparaathouders.

Door De Bruyn Ouboter, Beijer & Van Slogteren (1951) en Van Koot, Van Slogteren, Cremer & Camfferman (1954) werden reeds electronenmicroscopische opnamen van draadvormige deeltjes in het sap van planten, besmet met PV2, gepubliceerd.

Samenvattend kan worden opgemerkt, dat er waarschijnlijk geen principieel verschil bestaat tussen het gedrag van de karakteristieke deeltjes, voorkomende in preparaten van PV1- en PV2- houdend sap. De verschillen die bij een oppervlakkige beschouwing van de weergegeven electronenfoto's opvallen, kunnen mogelijk worden toegeschreven aan dezelfde factoren, die bij onze huidige kennis het willekeurig aandoende gedrag van deze beide bonenviren bepalen. Men zou dan kunnen aannemen, dat het sedimenterende virus de amorfe substantie meevoert met als gevolg, dat de in de vloeistof achterblijvende draadvormige deeltjes nagenoeg vrij hiervan op de electronenfoto's waarneembaar zijn. Ten einde dit nader te toetsen is het noodzakelijk dat ook onderzoek wordt verricht aan niet gecentrifugeerd sap van planten besmet met PV1.

6. SAMENVATTING

In een viertal hoofdstukken worden onderzoekingen beschreven, betrekking hebbend op drie viren die karakteristieke ziektesymptomen op boon (*Phaseolus vulgaris* L.) teweeg brengen, nl. *Phaseolus-virus 1* (PV1, twee stammen), *Phaseolus-virus 2* (PV2, twee stammen) en een virus uit witte klaver (WKV). Deze onderzoekingen betreffen symptomatiek, waardplanten, eigenschappen in vitro, optreden en verspreiding in het veld, overbrenging door *Myzus persicae* Sulz. en *Aphis fabae* Scop., alsmede zuivering ten behoeve van electronenmicroscopie.

Na een korte Algemene inleiding worden in Hoofdstuk 2 bijzonderheden gegeven over PV1 en PV2, en in Hoofdstuk 3 over WKV.

PV1 kan alleen boon aantasten, waarbij steengrauw (een acuut verschijnsel) en rolmozaiek (een chronisch ziektebeeld) als symptomen optreden. Voorts kan dit virus bij bepaalde bonenrassen zwartevaatziekte veroorzaken (hevige necrose, vnl. bij oudere planten optredend).

PV2 kan naast boon andere vlinderbloemigen besmetten, alsmede enige monocotylen, o.a. *Gladiolus*. Op de boon kunnen, afhankelijk van het ras van deze plant en de stam van het virus, twee typen van ziektebeelden worden onderscheiden, nl. topnecrose (een acuut verschijnsel) en scherpmozaiek (een chronisch symptoom).

Gegevens over het, in veldproeven gebleken, individuële gedrag na besmetting, respectievelijk met PV1 en PV2 van een aantal bonenrassen, worden in Aanhangsel I gegeven.

WKV kan naast witte klaver andere vlinderbloemigen, waaronder boon, aantasten. Op in de kas onderzochte bonenplanten verwekt het een diffuus mozaiekbeeld; op in het veld groeiende bonen werd het nog niet waargenomen.

PV1 en PV2 hebben overeenkomstige eigenschappen in vitro. WKV wijkt van deze viren af, aangezien het stabieler is en het sap van daarmee besmette bonen pas bij hogere verdunning zijn besmettelijkheid verliest.

PV1 en PV2 kunnen door *M. persicae* en *A. fabae* in een korte zuigtijd uit

daarmee besmette planten worden opgenomen en daarna op gezonde planten worden overgebracht. WKV werd, na korte zuigtijd, slechts in weinig gevallen alleen door *M. persicae* overgebracht.

De mate van verspreiding van PV1 en PV2 op het veld hangt sterk samen met het optreden van gevleugelde bladluizen.

In Hoofdstuk 4 worden de resultaten geanalyseerd van proeven aangaande de overbrenging van PV1 door *M. persicae* en *A. fabae*. *M. persicae* blijkt beter dan *A. fabae* tot opneming van virus gedisponeerd, terwijl zij minder snel het vermogen tot besmetting in opeenvolgende korte zuigtijden verliest. Uitvoerig cijfermateriaal, dat hierop betrekking heeft, is in Aanhangsel II bijeengebracht. Een eigen hypothese omtrent het mechanisme van opneming en afgifte van een non-persistent virus wordt gegeven.

In Hoofdstuk 5 zijn neergelegd de resultaten van electronenmicroscopisch onderzoek aan preparaten, vervaardigd van bloedingssappen en van verschillende fracties van perssappen van planten, respectievelijk besmet met WKV, de twee stammen van PV1 en de twee stammen van PV2. Hierbij is de bijzondere betekenis, die papierchromatografie als fractioneermethode bezit, duidelijk gebleken. Het voorkomen van kenmerkende deeltjes in het sap van planten, respectievelijk besmet met vier van de vijf onderzochte viren, kon in dit onderzoek uitsluitend met behulp van laatstgenoemde methode worden aangetoond. Planten, besmet met WKV gaven ook karakteristieke deeltjes in het bloedingsvocht te zien. De aard van de betreffende deeltjes komt tot uiting in de in Fig. 19 t/m 24 weergegeven electronenfoto's.

Schrijver wil gaarne zijn hartelijke dank betuigen aan de Dames G. VAN DE KOLK en TAN TIAN NIO voor hun assistentie bij de vele werkzaamheden en aan de Heer C. F. SCHEFFEL, fotograaf van het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek te Wageningen, voor de vervaardiging van de foto's, gereproduceerd in Fig. 1 t/m 6, 8, 10, 11, 13 t/m 16 en 18.

7. SUMMARY[1])

7.1. General Introduction

A description is given of investigations regarding three viruses which produce characteristic diseases in French beans (*Phaseolus vulgaris* L.), viz. *Phaseolus*-virus 1 [2]) (PV1, two strains), *Phaseolus virus* 2 [2]) (PV2, two strains) and a virus isolated from white clover (WKV). These investigations include symptomatology, host plants, properties *in vitro*, occurrence and spread in the field, transmission by *Myzus persicae* Sulz. and *Aphis fabae* Scop. and purification for electron microscopy. Details of the reactions of a number of bean varieties to infection with PV1 and PV2 in field trials are summarized in Appendix I.

7.2. Phaseolus virus 1 and 2

Phaseolus virus 1

After a short review of literature concerning the two viruses, a description is

[1]) The author is greatly indebted to Mr. IVAN BUDDENHAGEN, Oregon State College, Corvallis, Oregon, for much help in the preparation of the English text.

[2]) According to the nomenclature of SMITH (1937).

given of symptoms and host ranges. Two isolates of PV1, designated as strain RM and strain W, were studied. These strains differ slightly in the symptoms expressed on the bean varieties Beka and Dubbele Witte zonder draad. The symptoms caused by strain W are somewhat more pronounced than those produced by the other strain (Fig. 1). Both bean varieties mentioned respond with local symptoms after inoculation with juice from PV1 infected plants (Fig. 2). However, these local symptoms only develop after the virus has become established throughout the whole plant. The variety Beka commonly shows an acute systemic reaction, viz. necrosis of the uppermost part of the stem (Fig. 3) and a curling with veinal necrosis of the leaves which were developing at the time the plant was inoculated. This curling is accompanied by a yellowish or brownish discoloration, a symptom called „steengrauw" in Dutch (Fig. 4). In the chronic phase of the disease, Beka plants recover and form leaves which show common mosaic. Pods formed on these plants sometimes show a light-green curved stripe along the length of the pod (Fig. 4). The variety Dubbele Witte zonder draad never shows any „steengrauw" or top necrosis after inoculation with the PV1 strains studied, but develops only common mosaic.

Another type of symptom called „black root" in the U.S.A. has also been found in the Netherlands. It is a heavy necrosis (Fig. 5, 6) which may occur in certain bean varieties which are „resistant" to common bean mosaic. A reaction of hypersensitivity to infection with PV1 is the symptom of „black root" and according to GROGAN & WALKER (1948), it develops under conditions of relatively high temperature. Under controlled greenhouse conditions, „black root" could only be reproduced in experiments at Wageningen by means of approach grafting a PV1-infected plant responding with mosaic onto a plant of a hypersensitive variety. This method was first used by GROGAN & WALKER.

Production of „black root" was also obtained by inserting small stem pieces of a bean plant showing common mosaic caused by PV1 into healthy plants of the variety Servus. This variety was known for its severe „black root" reaction in the field. The Servus plants were near flowering and after insertion they were kept in a small room illuminated daily from 7 to 22 o'clock by fluorescent lamps. The lamps were attached close to each other about 70 cm above the level where the plants in pots were placed. The temperature fluctuated between 15°C (at night) and 29°C (at noon). Small stem pieces from a mosaic diseased bean plant were inserted into 8 plants; 5 of these showed strong symptoms of „black root" within 2 weeks.

In a field trial carried out in 1953 it was found that a difference exists in incidence of „black root" among three varieties which all may respond with this necrosis to PV1. In August 1953 37.6% of the plants of the variety Servus showed „black root" compared with 3.0 and 4.2% of such plants of varieties Furore and Voorluk, respectively. This might be due to the fact that Servus is much earlier in its development than the other two varieties. KLINKOWSKI & BEHR (1953) have shown with respect to this that „black root" mainly develops in plants which have entered the flowering stage.

In a field experiment at Wageningen in 1954, beans of the varieties Servus and Dubbele Witte zonder draad were sown at weekly intervals from the beginning of May until the middle of August beside a row of beans infected through the seed with PV1 to about 25%. This row of beans was the variety Noordhollandse

Bruine, a variety which responds to PV1 by producing mosaic symptoms. During the season, records were made of the temperature about 10 cm above ground by means of a thermograph. Incidence of aphid flight, especially of *Myzus persicae* and *Aphis fabae* was measured by means of a yellow trap, first used by MOERICKE (1951) and modified by HILLE RIS LAMBERS (1953). Each plot sown on one day with one variety, contained 65–80 plants. The plots were examined on various dates until the end of September, and the number of plants showing mosaic (var. Dubbele witte zonder draad) and ,,black root" (var. Servus) were recorded. Tables IV and V give the results of these observations. It can be supposed that when diseased plants first showed symptoms they had been inoculated by aphids 2–3 weeks earlier, as the incubation period under these conditions is about 2 weeks. Table IV demonstrates that there is a close relationship between the velocity of PV1 spread and the numbers of winged aphids caught (Fig. 7). Beans which emerged in the period from about the end of June to mid-July must have been infected immediately as all plants in those plots were diseased on the same date. This corresponded with the maximum aphid flight. When the number of winged specimens decreased it took a longer time before all plants in the later sown plots became diseased.

The first symptoms of ,,black root" in the bean variety Servus were observed at the beginning of August (Table V). The symptoms consisted of localized necroses of veins on the older leaves (Fig. 8). By August 11 all plants from the three first-sown plots were ,,black root" diseased. This sudden outbreak of the disease might have some connection with the temperature from July 24th to August 11th. During this period no minimum temperatures below 10°C occurred, whereas the maximum temperatures were daily above 20°C (Fig. 9). From Table V it is also apparent that the stage of the plant plays an important role in the incidence of the ,,black root" disease. The plants of the variety Dubbele Witte zonder draad sown June 25th were by July 27 100% mosaic-affected by PV1. These plants must have been visited about July 6th when they emerged, by virus-carrying aphids. At this time virus-carrying aphids probably visited the Servus plants, which had been sown on the same date as the other variety. However, only 9% of these Servus plants showed ,,black root" even as late as September 27th. In contrast 100% of the Servus plants sown in May developed ,,black root" by the beginning of August. Although both groups of Servus plants probably had been inoculated with PV1 before the period of higher temperatures in late July, the group showing 100% symptoms was at a later stage of development during this time of higher temperatures.

PV1 could only be introduced into French bean: its properties in vitro are summarized in Table I. This virus is of the non-persistent type; *M. persicae* being a better vector than *A. fabae* (Tables II and III).

Phaseolus virus 2

Two isolates of PV2 have been studied, one from a field-grown bean showing severe necrosis, the other from a gladiolus plant showing no distinct symptoms. The strains are designated as TN and D respectively. Strain TN causes a heavy top necrosis in the bean varieties Dubbele Witte zonder draad and Beka. Usually Dubbele Witte zonder draad is killed; Beka often shows recovery after initial top necrosis and produces new shoots affected by a type of mosaic. Strain D does not produce any necrosis on these bean varieties but is characteris-

ed by a mosaic (Fig. 10). The variety Servus reacts with mosaic from either virus strain, the mosaic of strain D being milder than of strain TN. On Servus either strain sometimes produces local chlorotic spots (Fig. 11).

Both PV2-strains have been introduced separately into a number of other plant species, viz. pea, broad bean, alsike clover, and crimson clover, all species reacted with mosaic symptoms. Several times it has been tried without success to introduce both strains separately into white and red clover. Either strain produces tiny local lesions on *Gomphrena globosa.*

The properties *in vitro* of PV2 are summarized in Table VI.

PV2 behaves as a non-persistent virus (Table VII). Later transmission trials with PV2 were not always as good as those illustrated in Table VII.

In field experiments carried out in 1949 with two gladiolus varieties (Sneeuwprinses and Nieuw-Europa), the work of McWhorter, Boyle & Dana (1947) which demonstrated that gladiolus may act as a carrier of PV2, was confirmed. Beans grown beside a row of Nieuw-Europa gladioli showed a higher incidence of the disease than those beside a row of Sneeuwprinses (Fig. 12).

In 1954 another field experiment was carried out to observe again the transmission of PV2 from gladiolus plants to beans. Gladioli (variety Nieuw-Europa) were planted in 3 rows on a strip 8 m long and 0.50 m wide. Beans (variety Dubbele Witte zonder draad) were sown in rows of 5 m at right angles to the gladiolus rows, at weekly intervals from May 14th to June 18th. On four dates (July 2nd, 9th, 20th and 27th) records of disease incidence were made. Not far from this field trial beans carrying PV1 were present, and as a consequence this virus was also spread to the beans growing in the plot. On July 27th all bean plants in the PV2 trial were infected and showed either PV1-symptoms (common mosaic) or PV2 (heavy top-necrosis). Observations on August 11th revealed that many plants only mosaic diseased before, showed top necrosis. By the end of August nearly all plants became necrotic. Data on incidence of PV1 and PV2 in this experiment are summarized in Table VIII. When compared with the data from Table IV it appears that virus spread in the gladiolus plot was slower than spread of PV1 in the experiment with infected beans as infection source. Probably this was a consequence of the larger dimensions of the gladiolus trial where the viruses had to be transmitted over greater distances than in the small plots of the other field experiment.

7.3. The virus from white clover

In 1953 during his stay in Wageningen, Dr J. W. Oswald, from Davis California, isolated a virus from a mosaic diseased white clover plant, which induced a mild veinal mosaic in Beka beans (Fig. 14). So far this virus has never been found in field-grown beans in the Netherlands. Local symptoms caused by the virus on Beka consisted of diffuse light green spots which later became surrounded by brownish rings (Fig. 13). The virus was also transmitted mechanically to broad bean, pea, and to red clover, white clover, crimson clover and alsike clover. Broad bean reacted with diffuse, irregular brownish local lesions and a faint, irregular, systemic mottling. Pea reacted with wilting and shriveling of the inoculated leaves and chlorosis in the top of the plant. Affected plants were severely stunted. In the clover species the virus produced a mottling parallel with the veins.

The properties *in vitro* of WKV are summarized in Table IX. This virus has

a higher inactivation point, a higher dilution end point and can be stored longer at room temperature without loss of infectivity than PV1 or PV2.

An antiserum was produced by injecting rabbits with dialyzed uncentrifuged sap of Beka beans infected with WKV. This antiserum reacted specifically with its own virus, but did not give any reaction with lucerne mosaic virus or PV2 (Table X).

WKV reacted also with an antiserum prepared in 1951 against a virus isolated from white clover in 1947 and maintained until 1951. As the 1947 virus isolate was later lost, it was not possible to carry out serological cross-reactions. However, WKV gave the same kind of precipitate with the 1951 antiserum as with its homologous antiserum.

It is supposed that WKV belongs to the group of viruses separated by JOHNSON (1942) which were earlier considered to be one virus: *Trifolium virus 1*. No investigations have been made to determine whether or not WKV is a mixture of viruses. WKV was transmissible with difficulty by *M. persicae* in very short feeding times; *A. fabae* did not transmit the virus in the experiments.

7.4. Investigations on the transmission of strains RM and W of Phaseolus virus 1 by means of Myzus persicae and Aphis fabae

After a review of literature on the transmission of non-persistent viruses, a description is given of experiments concerning the transmission of PV1 strains. In these studies wingless adults of *M. persicae* and *A. fabae* were used. *M. persicae* was reared on virus-free pepper or turnip plants, *A. fabae* on broad beans.

It was found that bean leaves infected with PV1 by means of an aphid (*M. persicae* or *A. fabae*) gave a characteristic reaction in the area where the aphid fed and the virus was introduced. This reaction was an irregularly shaped area of discoloration to lighter green and yellow in the neighbourhood of the point where the virus was introduced (Fig. 15). In an advanced stage this yellowing expanded over that half of the leaf where the virus was introduced. Often a necrosis along the veins developed, and the final picture was the same as that of bean leaves inoculated with sap containing PV1.

To determine if differences in plant ages affected transmission rates, bean plants 15, 18, and 20 days old, but all in the primary leaf stage, were used as test plants. These differences in plant ages did not affect transmission rates by aphids which were first fasted for 1 to 2 hours (Table XI). The size of the primary leaves varied in proportion to the ages of plants (Fig. 16).

Table XII summarizes a study of the transmission of PV1 strain RM by means of *M. persicae* to a succession of 20 bean plants. The aphids were first fasted for at least 1 hour. In this experiment each of five aphids passed 20 test plants, feeding one time on every plant. The place where each aphid fed was marked with China ink. In total 10 aphids were tested. Infection and test feedings did not exceed 15 seconds. Out of the 10 aphids tested, 7 transmitted the virus. From the results of this experiment it appears that *M. persicae* may infect many plants after a short feeding of 15 sec. maximum on a diseased plant. However, it does not infect all plants in succession as many plants remained healthy although a succeeding plant became diseased. The ability of the aphids to cause infection decreased when they passed more plants. Aphid no. 5 was still able to infect the 19th plant.

Since all aphids used in some experiments did not transmit virus a study was made to determine if the age of the infection source affected virus transmission. Table XIII gives a review of the 17 series of experiments which were carried out regarding this. Data collected in 13 series out of these 17 series of experiments concerning the aphids which actually transmitted the PV1 strains are summarized in Appendix II. The data of series 8, 9, 16, and 17 have been omitted as they concern aphids which were directly transferred from the source of infection to the test plant where they were localized following the method of WALRAVE (1951), for one night. As can be seen in that table both PV1 strains were used as well as both aphid species. All aphids were given a preliminary fasting of 1–2 hours. Every series of experiments had its own infection source (the first trifoliate leaf of a diseased plant) which grew older in the course of the series. After one initial infection-feeding each aphid was transferred to a bean plant which had only developed its primary leaves. On this plant it was allowed to feed four times, one feeding on each half of each primary leaf.

In the series 1–5 and 10–13, feeding periods did not exceed 15 seconds and aphids were killed after the fourth test feeding. In the other series the length of the feeding periods were determined by the aphids themselves.

Table XIV gives the numbers of aphids which transmitted virus on various dates. The results of Table XIV show that the age of the infection source generally does not affect the incidence of transmission of PV1 by *M. persicae* or by *A. fabae*. However, there was a tendency for strain W to be picked up less easily from older leaves than from younger leaves by aphids feeding for 15 sec. maximum. This tendency only showed clearly in series 1 and 3. In other series completely negative results may be noted, but there is no indication that this is due to the age of the infection source. It is remarkable that a completely negative result in virus transmission occurred only once in the series 6–9 and 14–17, viz. experiment no. 3 of series 9. However, this experiment was a limited one as only 3 *A. fabae* were tested. As will be shown later the good results of series 6–9 and 14–17 probably can be ascribed to the „free" infection feeding. This is in agreement with the results of BRADLEY & RIDEOUT (1953) in their study of the transmission of potato virus Y in tobacco by three species of aphids.

Since in the series 6–9 and 14–17 the aphids were allowed to feed freely once on the infection source and four times on the test plant, it was possible to analyze the effect of length of infection-feeding time on the incidence of transmission. Table XV summarizes the results of this analysis. Duration of infection-feedings of all aphids was divided into the following time groups: 1–15 sec., 16–30 sec., 31–60 sec., 61–120 sec., and more than 120 sec. Moreover, numbers of aphids that later proved to have acquired the virus were counted according to the time groups.

From Table XV it appears that *M. persicae* was a much better vector than *A. fabae* as 67% of *M. persicae* transmitted both PV1 strains and only 32% of *A. fabae* did so. The majority of aphids of both species had feeding times of 16–30 sec. after a fasting period of 1–2 hours. Although the number of aphids having infection-feedings longer than 60 sec. was relatively small, there is an indication that this infection-feeding length is not harmful to transmission by *M. persicae*. However, infection-feeding of less than 16 sec. was less favourable for transmission than one of 16–30 sec. It is probable that the lower transmission rates in other series (no. 1–5) where the aphids were given feeding

periods of 15 sec. maximum were due to the short length of the infection-feeding.

The effect of length of test feeding of virus-carrying aphids in series 6, 7, 14, and 15 on the incidence of transmission was also studied. In this group of series aphids fed four times on the test plants. The data of this analysis are summarized in Table XVI. These data also show the majority of both vectors had feeding times of 16–30 sec. With *M. persicae* there was no clear-cut effect of the length of the test-feeding period (within one minute) on the rate of transmission. Test feedings lasting longer than one minute have not been considered as numbers of aphids with feeding periods that long were relatively small. However, *A. fabae* transmitted better in test feedings of 16–30 sec. than in test feedings of 1–15 sec.

Table XVII presents a comparison among the 1st, 2nd, 3rd, and 4th successive punctures, of numbers of infections obtained by virus-carrying aphids. It was possible to determine which punctures resulted in infection because of the local reaction of the leaf near virus-introduction punctures. This analysis was made with the data collected in series 6, 7, 14, and 15 („free" feeding times) as well as with those from the series 1–5 and 10–13 („restricted" feeding times of 15 sec. maximum). The series having „free" feeding times was kept separate from the other series because the lengths of infection feedings were usually not the same.

Table XVII shows that there was a decrease in the number of successful test feedings from puncture 1 to puncture 2 to puncture 3 to puncture 4. (The only exceptions were in series 6 and 14 where *M. persicae* was „free" fed). The data summarized (totals from 1, 2, and 4; 10 and 12; 3 and 5; 11 and 13) for the combinations of virus strains and vectors especially showed this decrease[1]). Fig. 17 consists of two graphs showing this decrease, one for *A. fabae* and the other for *M. persicae*. From these graphs it appears that both aphids after 15 sec. maximum infection feedings carried less virus at the last test-feeding period than at the first. The transmission rates for *A. fabae* decreased more rapidly than the rates for *M. persicae*. However, the number of infections caused by *A. fabae* in the first test feeding was significantly greater than the number caused by *M. persicae*[2]).

A summary of the results of the 17 series of experiments follows:

1. *M. persicae* transmitted PV1 much better than *A. fabae*.
2. The majority of the aphids of both species fed for the short feeding time of 16–30 sec. on beans after 1–2 hours of fasting.
3. In order to acquire PV1 from an infected bean an infection-feeding period of 16–30 sec. was more favourable than a period of 1–15 sec. for both aphid species.
4. Test-feeding periods of 1–15 sec. used to transmit the virus were as favourable as test-feeding periods of 16–30 sec. for *M. persicae*. For *A. fabae*, however, periods of 16–30 sec. were more favourable.
5. The ability to cause infection in successive feeding punctures usually decreased in the order of succession of punctures with both vectors. However,

[1]) Mr. L. C. A. Korsten, head of the Department of Mathematical Analysis, Government Institute for Research on Varieties of Field Crops at Wageningen has confirmed this mathematically using a special application of the test of Wilcoxon.

[2]) This has also been confirmed statistically by Mr. Korsten.

this decrease was not noticed with *M. persicae* which had acquired virus within a „free" infection-feeding period.
6. The ability to infect in successive short test-feeding periods decreased more rapidly with *A. fabae* than with *M. persicae*.
7. The number of infections caused by PV1-carrying *A. fabae* in the first test-feeding puncture was higher than that of *M. persicae*.

This chapter ends with some considerations on the transmission of non-persistent viruses. In view of the results of the experiments presented here, and of those obtained by other workers, an hypothesis concerning the transmission of PV1 by its vectors is advanced. It is assumed that the vectors acquire the virus during brief punctures of epidermal cells only when very small or no quantities of saliva are produced. With the production of more saliva and especially when a salivary sheath is formed during deeper penetrations of the leaf, no virus can be acquired, nor can it be acquired when the aphid punctures the epidermis intercellularly. Many workers have postulated strictly separate flows of food and saliva in the stylets, each in its own duct. Following this postulate it is now suggested that virus which enters the food duct in the stylets can never be re-injected into the plant, and that it is impossible for the virus to enter the salivary duct. As the procedure of transmission of a non-persistent virus is only a matter of a few tenths of seconds and sometimes even less, it is unimaginable that the virus passes the whole body in that short period. As a consequence it is assumed that the virus becomes attached in one way or another to the outer surface of the stylets from which it may be removed only by washing or elution. As the finer structure of the outer surface of the stylets may differ between aphid species, this might account for the differences in vector efficiencies.

7.5. Purification of the bean viruses for electron-microscopy

This chapter starts with a summary concerning literature on various methods used to obtain preparations of plant viruses in a form suitable for electron-microscopy. An account is then given of the use of some of these methods with the juices of bean plants infected with PV1, PV2 or WKV.

An important difficulty in the purification of PV1 and PV2 is that both are rather unstable, and moreover they sometimes have the tendency to sediment completely during centrifugation at 12,000 r.p.m. for 30 min., or even less. Besides this variable harmful effect of low-speed centrifugation on the virus concentration in the supernatant, this procedure is not efficient enough to get rid of all the substances which interfere in the purification of specific particles by ultracentrifugation. Ultracentrifugation during 1 hour at about 37,000 r.p.m. actually resulted in the sedimentation of all infective particles when they were present in the low speed centrifuged sap of bean plants infected with PV1 or PV2.

A suspension of the green sediment in water did not show any difference in the electron-microscope as compared with the same preparation of sap from healthy beans. Moreover, no essential difference could be detected in sedimentation diagrams made with an analytical rotor from analogous preparations of healthy and diseased plants. Explanations might be that concentration of

the virus was too low to demonstrate its presence, or that the virus sedimented at the same rate as some normal constituent.

Electron-microscope observations were also made of the clear, colourless droplets produced on the cut stems of bean plants infected with WKV, PV1, or PV2, respectively. These plants and healthy control plants were growing in a common nutrient solution. One week after inoculation with the strains of PV1 and PV2, respectively, when the plants showed the first systemic symptoms, they were cut under the cotyledons. The culture solutions were replaced by water at a temperature of 40–45° C. The exudates produced by the cut stem were collected in a capillary tube, the end of which was just above the wounded stem. Within a few hours enough exudate was collected for the production of electron-microscope specimens and for the inoculation of some healthy bean plants. Inoculations of beans were also made with juice prepared separately from leaves and roots of the plants which had produced the exudates. Although these separate preparations revealed the presence of virus in the leaves as well as in the roots, no virus activity was found in the exudates. Differences were not found between electron-microscope preparations of exudates from healthy plants and those from diseased plants.

The same procedure carried out with bean plants inoculated four weeks earlier with the PV1 and PV2 strains, also gave negative results. However, better results were obtained using plants which had been inoculated 2 or 4 weeks earlier with WKV. The exudates produced by these plants revealed the presence of slightly curved rod-shaped particles similar to those shown in Fig. 19. These particles were not found in comparable preparations of the exudates from healthy plants.

Using the paperchromatographic method described by RAGETLI & VAN DER WANT (In press) it was possible to demonstrate the presence of characteristic particles in the sap of bean plants infected with PV1 strain RM, PV1 strain W, PV2 strain TN, PV2 strain D, and WKV, respectively. In this method strips of Whatman no. 1 filterpaper were used, 6 cm wide and 56 cm long (Fig. 18a). In a rectangular area (called „origin" here) near one end of the strip 0.09 ml of sap was applied to the paper. The end near the origin was then clasped between two glass plates and folded along the line CD. The plates were placed in a small porcelain embedding dish and this dish was placed in a box containing a nitrogen atmosphere saturated with water, and water was also added to the porcelain dish. The air had been replaced by nitrogen in order to prevent a possible deleterious action by oxygen from the air on the viruses studied. The water gradually ascended between the glass plates and saturated the paper. After 5 to 6 hours the water had reached the line indicated as „finish" in Fig. 18a. Usually a second chromatogram of the same sap was run 3/4 hour after the first. When the latter was ready it was dried in 20 min. at 55° C, cut into halves and the left half was contact printed in ultraviolet light of about 265 mμ wave length on Agfa Brovira photographic paper BH1, hard white glossy.

On these contact prints, here called photograms, ultraviolet absorbing substances present on the paper strip could easily be localized (Fig. 18b). When the water reached the „finish" in the second chromatogram, this was cut into zones while still wet, according to the information given by the photogram of the first chromatogram. For convenience sake the paper had been divided by pencil-drawn lines into equal zones, numbered 1–22. The cut zones were extract-

ed by small volumes of water and extracts were sucked through hard filter paper to remove cellulose fibers. From these extracts, electron-microscope preparations were made and also a part of each extract was inoculated into bean plants.

First, paperchromatography was tried with centrifuged sap to which a 1% KCN-solution in the proportion of 9 sap: 1KCN-solution had been added before centrifugation. The use of centrifuged sap, however, did not result in the detection of characteristic particles in the sap of beans infected with the PV2 strains TN or D, probably as a consequence of the virus sedimenting effect of low-speed centrifugation. Therefore, uncentrifuged sap also with the addition of the KCN-solution was used, but no differences in the electron-microscope preparations between extracts from chromatograms of healthy and PV2-infected extracts could be detected. Fractionation of the sap components had not advanced enough, presumably as a consequence of too high a concentration of the sap. Diluting the sap, however, gave far better results. To the diluted sap 1% KCN-solution was also added in the proportion mentioned above. The effect of centrifugation and dilution of the sap of Servus beans infected with PV2 strain TN on the result of chromatography as indicated by the photograms of the chromatograms, is pictured in Fig. 18b. The same chromatographic effects were obtained from the sap of healthy plants as from the sap of plants infected with each of the other viruses.

No. 1 in Fig. 18b is a photogram of a chromatogram from undiluted, uncentrifuged sap; no. 2 from sap diluted with 2 volumes of distilled water, and no. 3 from centrifuged undiluted sap.

Electron-micrograms of various specimens prepared according to the described paperchromatographic method of separation are given in Figures 19–24. A short description of each follows:

Fig. 19. Extract from zone 10–10.5 of the chromatogram of centrifuged sap from Beka beans infected with WKV. The zone was extracted with 1 ml of water. All 4 bean plants inoculated with remaining extract from the same zone developed the disease.

Fig. 20. Extract from zone 10.5–12 of the chromatogram of centrifuged sap from Beka beans infected with PV1 strain RM. The zone was extracted with 1 ml of water. All 4 bean plants inoculated with the remaining extract developed the disease.

Fig. 21. Extract from zone 5.5–7 of the chromatogram of centrifuged sap from Beka beans infected with PV1 strain W. The zone was extracted with 1 ml of water. All 4 bean plants inoculated developed the disease. The particles shown in Fig. 21 are covered by a layer of very fine material. In other electron-micrograms which revealed no specific particles, particles may have been present but obscured by an even thicker layer of material.

Fig. 22. Extract from zone 8–12 of the chromatogram of centrifuged undiluted sap from healthy Beka beans. This zone was extracted with 2 ml of water.

Fig. 23. Extract from zone 5–6.5 of the chromatogram of uncentrifuged, diluted sap from Servus beans infected with PV2 strain TN. The zone was

extracted with 1 ml of water. From 3 bean plants inoculated one developed the disease. This slight infectivity is presumably due to the original dilution of the sap.

Fig. 24. Extract from zone 10–11.5 of the chromatogram of uncentrifuged, diluted sap from Beka beans infected with PV2 strain D. The zone was extracted with 1 ml of water. All 3 bean plants inoculated developed the disease.

De Bruyn Ouboter et al. (1951) and Van Koot et al. (1954) have also shown the presence of thread-like particles in the sap of other plants infected with PV2 by using conventional methods.

It appears that all preparations made from sap from the infected plants contained particles which were not present in sap of healthy plants. The thread-like particles present in the juice of plants infected with the PV1 strains tended to aggregate in longer threads than those in the sap of plants infected with WKV. During the electron-microscopic examination of the particles present in the preparations of sap from plants infected with PV1 many particles showed a striking adsorption of amorphous material.

In the electron-micrograms reproduced in Fig. 23 and 24 the strong aggregation of thread-like particles to curled skeins is very striking. Some of these skeins are partly disentangled and show thin, possibly single threads (indicated by white arrows). A tendency to form skeins can already be noticed in the preparation from the chromatographed sap of plants infected with PV1 strain RM (Fig. 20). Figures 23 and 24 also show the association of amorphous material with the skeins of thread-like particles. This tendency of the threads to aggregate and associate with amorphous particles may be responsible for the loss of the virus during centrifugation, by forming heavier aggregates which are sedimented out.

Finally, it can be said that there is probably no essential difference between the characteristic particles present in the sap of PV1 and PV2-infected beans. The differences which appear by superficial examination might be attributed to the difference of preparation of the saps before they were chromatographed. Possibly the proportion of virus to that of amorphous bodies governs whether or not virus relatively free from amorphous bodies (Fig. 20) is obtained. To test this possibility it would be necessary to examine uncentrifuged sap of beans infected with PV1, as was done with sap from PV2 infected plants (Figures 23 and 24).

8. LITERATUUR

BAWDEN, F. C., Plant viruses and virus diseases. Third edition. Chronica Botanica Comp., Waltham, Mass., 1950.

BAWDEN, F. C., R. P. CHAUDHURI & B. KASSANIS, Some properties of broad bean mottle virus. Ann. appl. Biol. 38: 774–784, 1951.

BAWDEN, F. C. & H. L. NIXON, The application of electron microscopy to the study of plant viruses in unpurified plant extracts. J. gen. Microbiol. 5: 104–109, 1951.

BEEMSTER, A. B. R. & J. P. H. VAN DER WANT, Serological investigations on the Phaseolus viruses 1 and 2. Antonie van Leeuwenhoek 17: 285–296, 1951.

BERKELEY, G. H., Some viruses affecting gladiolus. Phytopath. 43: 111–115, 1953.

BRADLEY, R. H. E., Studies on the aphid transmission of a strain of henbane mosaic virus. Ann. appl. Biol. 39: 78–97, 1952.

BRADLEY, R. H. E., Infectivity of aphids after several hours on tobacco infected with potato virus Y. Nature 171: 755, 1953.

BRADLEY, R. H. E., Studies of the mechanism of transmission of potato virus Y by the green peach aphid, Myzus persicae (Sulz.) (Homoptera: Aphidae). Can. J. Zool. 32: 64–73, 1954.

BRADLEY, R. H. E. & D. W. RIDEOUT, Comparative transmission of potato virus Y by four aphid species that infest potato. Can. J. Zool. 31: 333-341, 1953.

BRIDGMON, G. H. & J. C. WALKER, The relation of southern bean mosaic to black root. Phytopath. 41: 865–871, 1951.

BRIDGMON, G. H. & J. C. WALKER, Gladiolus as a virus reservoir. Phytopath. 42: 65–70, 1952.

BRUYN OUBOTER, M. P. DE, J. J. BEIJER & E. VAN SLOGTEREN, Diagnosis of plant diseases by electron-microscopy. Antonie van Leeuwenhoek 17: 189–208, 1951.

CREMER, M. C., The preparation of antiserum against potato virus Y. Proc. Conf. Potato Virus Diseases, Wageningen-Lisse, 1951: 85–87, 1952.

FAJARDO, T. G., Studies on the mosaic disease of the bean (Phaseolus vulgaris L.). Phytopath. 20: 469–494, 1930a.

FAJARDO, T. G., Studies on the properties of the bean-mosaic virus. Phytopath. 20: 883–888, 1930b.

FLUITER, H. J. DE & G. W. ANKERSMIT, Gegevens betreffende de aantasting van bonen (Phaseolus vulgaris L.) door de zwarte bonenluis (Aphis (Doralis) fabae Scop.). Tijdschr. Pl.ziekten 54: 1–13, 1948.

FRANDSEN, N.O., Untersuchungen zur Virusresistenzzüchtung bei Phaseolus vulgaris L. I. Phytopathologische Untersuchungen. Z.Pfl.züchtung 31: 381–420, 1952.

GROGAN, R. G. & J. C. WALKER, Interrelation of bean virus 1 and bean virus 2 as shown by cross-protection tests. Phytopath. 38: 489–493, 1948a.

GROGAN, R. G. & J. C. WALKER, A pod-distorting strain of the yellow mosaic virus of bean. J. agr. Res. 77: 301–314, 1948b.

GROGAN, R. G. & J. C. WALKER, The relation of common mosaic to black root of bean. J. agr. Res. 77: 315–331, 1948c.

GUTHRIE, J. W. & R. W. FULTON, Virus-like particles in Solanum tuberosum. Phytopath. 44: 473–478, 1954.

HARTER, L. L. & W. J. ZAUMEYER, A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S. Dep. Agr. Techn. Bull. 868, 1944.

HEINZE, K., Die Überträger pflanzlicher Viruskrankheiten. Mitt. Biol. Zentralanst. Land- und Forstwirtsch. (Berlin-Dahlem) 71, 1951.

HILLE RIS LAMBERS, D., Onderzoekingen over de perzikbladluis. In: Landbouworganisatie TNO, Verslag over het jaar 1952: 43–47, 1953.

HOUSTON, B.R. & J. W. OSWALD, The mosaic virus disease complex of Ladino clover. Phytopath. 43: 271–276, 1953.

HOUTMAN, G., „Gladiolenziek" van bonen. Landbouwvoorlichting Noord-Holland no. 17, 1949.

HUBBELING, N., De invloed van de uitwendige omstandigheden bij het optreden van boonenziekten. Tijdschr. Pl.ziekten 48: 225–234, 1942.

HUBBELING, N., Ziekten en beschadigingen van bonen. In druk (*In press*).

HUYSKES, J. A., Bestrijding van boonenmozaiek en het gebruik van resistente variëteiten. (Voorloopige mededeeling). Meded. Tuinbouwvoorlichtingsdienst 18, 1940.
JENKINS, W. A., A new virus disease of snapbeans. J. agr. Res. 60: 279–288, 1940.
JENKINS, W. A., A histological study of snap bean tissues affected with black root. J. agr. Res. 62: 683–690, 1941.
JOHNSON, B., The injurious effects of the hooked epidermal hairs of french beans (Phaseolus vulgaris L.) on Aphis craccivora Koch. Bull. entomol. Res. 44: 779–788, 1953.
JOHNSON, F., The complex nature of white-clover mosaic. Phytopath. 32: 103–116, 1942.
JOHNSON, J., Virus particles in various plant species and tissues. Phytopath. 41: 78–93, 1951.
KLINKOWSKI, M. & L. BEHR, Die „Schwarzbeinigkeit" der Phaseolus-Arten. Phytopath. Z. 20: 405–420, 1953.
KOOT, IJ. VAN, D. H. M. VAN SLOGTEREN, M. C. CREMER & J. CAMFFERMAN, Virusverschijnselen in Freesia's. Tijdschr. Pl.ziekten 60: 157–192, 1954.
MCWHORTER, F. P., L. BOYLE & B. F. DANA, Production of yellow bean mosaic in beans by virus from mottled Gladiolus. Science 105: 177–178, 1947.
MERKEL, L., Beiträge zur Kenntnis der Mosaikkrankheit der Familie der Papilionaceen. Z. Pfl.krankh. Pfl.schutz 39: 289–347, 1929.
MOERICKE, V., Eine Farbfalle zur Kontrolle des Fluges von Blattläusen, insbesondere der Pfirsichblattlaus, Myzodes persicae (Sulz.). Nachrichtenbl. d. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 3: 23–24, 1951.
NELSON, R., Transference of the bean-mosaic virus by Macrosiphum solanifolii. Science 56: 342–344, 1922.
NELSON, R., Investigations in the mosaic disease of bean (Phaseolus vulgaris L.). Mich. Agr. Exp. Stat. Techn. Bull. 118, 1932.
NOORDAM, D., Virusziekten bij chrysanten in Nederland. Tijdschr. Pl.ziekten 58: 121–189, 1952.
PIERCE, W. H., Viroses of the bean. Phytopath. 24: 87–115, 1934.
PIERCE, W. H., The identification of certain viruses affecting leguminous plants. J. agr. Res. 51: 1017–1039, 1935.
QUANTZ, L., Untersuchungen über Viruskrankheiten an Buschbohnen. Mitt. Biol. Zentralanst. Land. Forstwirtsch. (Berlin-Dahlem) 70: 74–79, 1951.
RAGETLI, H. W. J. & J. P. H. VAN DER WANT, Paper chromatography of plant viruses. In druk *(In press)*.
RANDS, R. D. & W. BROTHERTON, Jr., Bean varietal tests for disease resistance. J. agr. Res. 31: 101–154, 1925.
REDDICK, D. & V.B. STEWART, Transmission of the virus of bean mosaic in seed and observations on thermal death-point of seed and virus. Phytopath. 9: 445–450, 1919.
RICHARDS, B. L. & W. H. BURKHOLDER, A new mosaic disease of beans. Phytopath. 33: 1215–1216, 1943.
ROBERTS, F. M., Studies on the feeding methods and penetration rates of Myzus persicae Sulz., Myzus circumflexus Buckt., and Macrosiphum gei Koch. Ann. appl. Biol. 27: 348–358, 1940.
SILL, Jr., W. H., W. C. BURGER, M. A. STAHMANN & J. C. WALKER, Electron microscopy of cucumber virus 1. Phytopath. 42: 420–422, 1952.
SLOGTEREN, D. H. M. VAN, Serological micro-reactions with plant viruses under paraffin oil. Proc. 2nd. Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, June 25th–29th, 1954. In druk *(In press)*.
SMITH, K. M., A textbook of plant virus diseases. J. & A. Churchill Ltd, London, 1937.
SYLVESTER, E. S., Beet-mosaic virus-green peach aphid relationships. Phytopath. 39: 417–424, 1949.
SYLVESTER, E. S., Comparative transmission of beet mosaic virus by four aphid species. Phytopath. 42: 252–254, 1952.
THUNG, T. H., Waarnemingen over enkele plantenviren met het electronen-microscoop. Chron. Nat. 104: 344–348, 1948.
THUNG, T. H., Grondbeginselen der plantenvirologie. Meded. Landbouwhogeschool 49: 25–156, 1949.
WALRAVE, J., Een eenvoudige methode voor de localisatie van insecten op bepaalde bladeren van een plant. Tijdschr. Pl.ziekten 57: 126–127, 1951.
WANT, J. P. H. VAN DER, De belangrijkste ziekten van de boon (Phaseolus vulgaris L.) in Nederland, in het bijzonder de virusziekten. Meded. Dir. Tuinb. 12: 553–567, 1949.
WATSON, M. A., Factors affecting the amount of infection obtained by aphid transmission of the virus, Hy. III. Philos. Trans. roy. Soc. B. 226: 457–489, 1936.

WATSON, M. A., Further studies on the relationship between Hyoscyamus virus III and the aphis Myzus persicae (Sulz.) with special reference to the effect of fasting. Proc. roy. Soc. B. 125: 144–170, 1938.

WATSON, M. A. & F. M. ROBERTS, A comparative study of the transmission of Hyoscyamus virus 3, potato virus Y and cucumber virus 1 by the vectors Myzus persicae (Sulz.), M. circumflexus (Buckton), and Macrosiphum gei (Koch). Proc. roy. Soc. B. 127: 543–576, 1939.

WATSON, M. A. & F. M. ROBERTS, Evidence against the hypothesis that certain plant viruses are transmitted mechanically by aphides. Ann. appl. Biol. 27: 227–233, 1940.

WEISS, F., A key to the typical viruses of leguminous crops. Pl. Dis. Reptr 23: 352–361, 1939.

WILTEN, W., De „black root disease" van de boon (Phaseolus vulgaris) ook in Nederland? Tijdschr. Pl.ziekten 51: 91–92, 1945.

ZAUMEYER, W. J. & C. W. KEARNS, The relation of aphids to transmission of bean mosaic. Phytopath. 26: 614–629, 1936.

ZAUMEYER, W. J. & B. L. WADE, Mosaic diseases affecting different legumes in relation to beans and peas. Phytopath. 23: 562–564, 1933.

ZAUMEYER, W. J. & B. L. WADE, The relationship of certain legume mosaics to bean. J. agr. Res. 51: 715–749, 1935.

AANHANGSEL I
APPENDIX I

REACTIE VAN EEN AANTAL BONENRASSEN OP DE PHASEOLUS-VIREN 1 EN 2, ZOALS WAARGENOMEN IN VELDPROEVEN, DIE GEDURENDE ENIGE JAREN IN WAGENINGEN EN WEST-FRIESLAND WERDEN GENOMEN.

De onderzochte bonen werden in kleine vakjes naast infectiebronnen geteeld. Als infectiebronnen deden respectievelijk dienst: bonen, die tot een behoorlijk percentage secundair met *Phaseolus-virus 1* waren besmet en gladiolen besmet met *Phaseolus-virus 2*.

REACTION OF A NUMBER OF BEAN VARIETIES AGAINST PHASEOLUS VIRUSES 1 AND 2 AS DETERMINED IN FIELD EXPERIMENTS, CARRIED OUT AT WAGENINGEN AND WEST-FRIESLAND (PROVINCE OF NOORD-HOLLAND), DURING SEVERAL YEARS.

Beans were sown in small plots beside infection rows, viz. beans secondarily infected to a high degree with Phaseolus virus 1, and gladioli infected with Phaseolus virus 2.

GETOETSTE TUINBOUWBONENRASSEN
HORTICULTURAL BEAN VARIETIES TESTED

Ras *Variety*	*Phaseolus-virus 1*	*Phaseolus-virus 2*
Aiguille	zwak rolmozaiek	scherpmozaiek
Aurigena	zwak steengrauw	scherpmozaiek
Blanda	steengrauw + rolmozaiek	scherpmozaiek
Bon Jardinier de Mont Calme	– [1])	topnecrose-scherpmozaiek
Bounteous	–	zwak scherpmozaiek
Cabanais tardif	–	scherpmozaiek
Conserva zonder draad	steengrauw + rolmozaiek	scherpmozaiek
Crussol	steengrauw + rolmozaiek	scherpmozaiek
Dubbele Witte met draad	rolmozaiek	topnecrose
Dubbele Witte zonder draad	rolmozaiek	topnecrose
Favoriet	steengrauw + rolmozaiek	topnecrose
Florida Belle	zwartevaatziekte (zelden)	scherpmozaiek
Fruca media	rolmozaiek	scherpmozaiek
Furore	zwartevaatziekte (weinig)	topnecrose
Genfer Markt	steengrauw + rolmozaiek	scherpmozaiek, topnecrose
Golden May	steengrauw + rolmozaiek	scherpmozaiek
Granda	zwak rolmozaiek	scherpmozaiek
Groninger Weekschil	zwak steengrauw	topnecrose
Imuna	zwak rolmozaiek	zwak scherpmozaiek
Incomparable	zwak rolmozaiek	scherpmozaiek
Maireau	–	scherpmozaiek
Méridional	–	scherpmozaiek
Métis	–	scherpmozaiek
Parisia	steengrauw + rolmozaiek	scherpmozaiek
Perfect	rolmozaiek	topnecrose
Roem van Holland	rolmozaiek	topnecrose
Saint Marcellin	–	zwak scherpmozaiek
Saxa	steengrauw + rolmozaiek	scherpmozaiek
Servus	zwartevaatziekte	scherpmozaiek
Voorluk	zwartevaatziekte (weinig)	scherpmozaiek
Wachs Digoin	zwak rolmozaiek	zwak scherpmozaiek
Wachs Express	steengrauw + rolmozaiek	scherpmozaiek

[1]) – = geen symptomen
– = no symptoms

rolmozaiek = common bean mosaic
scherpmozaiek = yellow bean mosaic
zwartevaatziekte = black root
zwak = mild

GETOETSTE LANDBOUWSTAMBONEN

DRY SHELL BEANS TESTED

De meeste van de hierna te noemen rassen reageerden met hevige steengrauwsymptomen en rolmozaiek op *Phaseolus-virus 1*. Een uitzondering vormde het ras Walcheria, dat met rolmozaiek, zonder steengrauw reageerde. Ten aanzien van *Phaseolus-virus 2* reageerden de meeste rassen met een achterblijven in groei, samengaand met een topnecrose, waar de planten zich van herstelden onder vorming van scherpmozaiek. Ook hier vertoonde Walcheria een afwijkende reactie, nl. doorgaans een hevige topnecrose, waarvan de plant zich niet herstelde.

Het gaat hierbij om de volgende rassen: Aka, Bataaf, Beka, Ceka, Citroenboon, Exponent, Groninger Strogele, Kaboon, Krombek, Maro, Nanko, Noordhollandse Bruine en Walcheria.

Most of the dry shell beans mentioned, reacted on Phaseolus virus 1 with heavy „steengrauw" and afterwards with a mosaic. An exception was the variety Walcheria which reacted with mosaic only. Regarding Phaseolus virus 2 most varieties reacted with slight top necrosis and the production of yellow bean mosaic after recovery. In this case Walcheria was an exception again. Now it reacted with heavy top necrosis from which the infected plant did not recover.

AANHANGSEL II
APPENDIX II

RESULTATEN VAN 13 SERIES PROEVEN BETREFFENDE DE OVERBRENGING VAN DE PHASEOLUS-VIRUS 1-STAMMEN W EN RM MET BEHULP VAN MYZUS PERSICAE EN APHIS FABAE.

Aangegeven zijn: nummer van de serie, datum, waarop de virusbron geïnoculeerd werd en data waarop de overbrengingsproeven werden uitgevoerd. Alleen de resultaten van de proeven met luizen, die infectie hebben teweeggebracht werden vermeld.

De cijfers betreffen de zuigtijden op de besmettingsbronnen en op de toetsplanten in seconden. De zuigtijden, waarin besmetting werd teweeggebracht zijn vet gedrukt.

In de series 6, 7, 14 en 16 zoog iedere luis achtereenvolgens viermaal op een toetsplant en waren daarna gedurende een nacht op een tweede toetsplant gelocaliseerd. Indien deze tweede plant besmet werd is dit aangegeven met +. In alle andere series werden de luizen direct na de vierde zuigtijd op een toetsplant gedood.

RESULTS OF 13 SERIES OF EXPERIMENTS REGARDING TRANSMISSION OF PHASEOLUS VIRUS 1 STRAINS W AND RM WITH MYZUS PERSICAE AND APHIS FABAE.

Indicated are: date that virus-source was inoculated, and dates that transmission experiments were carried out. Only results of experiments in which virus transmission was obtained, are recorded here. The data concern times of infection and test feedings in seconds. Test feedings resulting in infection of the plant are given in bold figures.

In the series no 6, 7, 14, and 15 every aphid made four test feedings on each plant and was then localized on a second plant for one night. When the aphid infected this plant, it is indicated by +.

In all the other series aphids were killed directly after the fourth test feeding.

SERIE 1. *Phaseolus-virus 1* st. W; inoculatie besmettingsbron 9 November 1953
SERIES 1. *infection source inoculated November 9th, 1953*
vector: *Myzus persicae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetsplant in sec. *Test feeding in sec.*			
			1	2	3	4
30 Nov. 1953	1	8	13	14	**12**	6
	2	15	15	10	**15**	15
	3	15	**10**	11	15	7
	4	15	**11**	**15**	15	15
	5	15	8	**12**	9	9
	6	15	10	**13**	15	12
3 Dec. 1953	1	15	**15**	**9**	**15**	7
	2	15	15	15	**15**	8
	3	15	13	**15**	4	7
	4	15	10	**15**	7	11
	5	13	**13**	**9**	6	11
	6	15	3	**9**	9	8
7 Dec. 1953	1	15	15	10	**15**	**15**
	2	15	11	8	5	**11**
10 Dec. 1953	1	13	**13**	13	11	13

Serie 2. *Phaseolus-virus 1* st. W; inoculatie besmettingsbron 24 December 1953
Series 2. *infection source inoculated December 24th, 1953*
vector: *Myzus persicae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetsplant in sec. *Test feedings in sec.*			
			1	2	3	4
13 Jan. 1954	1	12	**5**	11	15	5
	2	15	**8**	9	9	10
	3	15	**15**	15	15	**15**
	4	15	**14**	15	4	**15**
	5	15	**15**	11	11	11
	6	12	13	**9**	9	13
	7	12	**15**	**11**	8	9
	8	15	**8**	11	9	12
18 Jan. 1954	1	15	13	11	9	**15**
	2	15	**8**	**9**	13	12
	3	15	**5**	15	15	**4**
	4	15	15	15	15	**15**
25 Jan. 1954	1	15	**15**	7	15	15
	2	13	13	**13**	6	9
	3	15	15	13	**14**	13
1 Febr. 1954	1	15	15	13	**15**	**15**
	2	15	**15**	9	**12**	**15**
	3	15	**15**	**15**	7	15
	4	15	**12**	15	–[1])	–
	5	15	**13**	15	15	15
8 Febr. 1954	1	15	15	**15**	15	14
	2	15	15	**15**	8	15

[1]) In dit geval is de luis na de 2e zuigtijd op de toetsplant gedood.
In this case the aphid was killed after the second test feeding.

Serie 3. *Phaseolus-virus 1* st. W; inoculatie besmettingsbron 24 December 1953
Series 3. *infection source inoculated December 24th, 1953*
vector: *Aphis fabae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetsplant in sec. *Test feedings in sec.*			
			1	2	3	4
12 Jan. 1954	1	15	**15**	**15**	15	15
	2	10	14	**9**	10	15
	3	15	**15**	8	12	14
18 Jan. 1954	1	15	15	15	15	**15**
	2	15	15	15	15	**15**
	3	15	**15**	15	15	15
	4	15	**15**	**15**	15	15
	5	15	15	**15**	15	15
25 Jan. 1954	1	15	**14**	15	13	15
	2	15	14	**15**	15	15
	3	15	**15**	15	15	15

Serie 4. *Phaseolus virus 1* st. W; inoculatie besmettingsbron 15 Maart 1954
Series 4. *infection source inoculated March 15th, 1954*
vector: *Myzus persicae*

Datum van proef *Date of experiment*	No luis. *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetsplant in sec. *Test feedings in sec.*			
			1	2	3	4
1 April 1954	1	15	**15**	**15**	**15**	**9**
	2	15	15	15	**14**	15
	3	15	11	**15**	6	15
	4	15	11	11	**14**	**5**
	5	15	15	15	**11**	**13**
	6	15	**15**	9	**9**	10
	7	15	**15**	**11**	**15**	**15**
	8	15	**15**	15	15	15
8 Apr. 1954	1	15	**15**	15	9	15
	2	15	**15**	**13**	15	–
	3	15	**14**	15	15	15
	4	15	**15**	10	15	**15**
	5	15	**15**	**15**	**15**	**15**
15 Apr. 1954	1	15	15	15	**8**	13
	2	15	15	15	**15**	11
	3	15	15	**15**	**15**	5
	5	15	**15**	**15**	**15**	9
	5	15	15	**15**	15	15
	6	15	**11**	**15**	15	**8**
22 Apr. 1954	1	15	15	15	15	**15**
6 Mei 1954	1	15	15	10	**6**	**15**

Serie 5. *Phaseolus-virus 1* st. W; inoculatie besmettingsbron 15 Maart 1954
Series 5. *infection source inoculated March 15th, 1954*
vector: *Aphis fabae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetsplant in sec. *Test feedings in sec.*			
			1	2	3	4
1 Apr. 1954	1	14	**15**	13	**15**	15
	2	15	15	**15**	15	15
	3	15	**15**	**8**	**9**	**11**
	4	12	**15**	**13**	**14**	15
22 Apr. 1954	1	15	**15**	12	15	15
	2	15	**15**	15	15	15
29 Apr. 1954	1	15	**15**	**15**	15	15
6 Mei 1954	4	15	**13**	15	12	15
	3	15	**15**	15	15	13

SERIE 6. *Phaseolus-virus 1* st. W; inoculatie besmettingsbron 22 Juni 1954
SERIES 6. *infection source inoculated June 22nd, 1954*
vector: *Myzus persicae*

Datum van proef *Date of experiment*	No luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetspl. in sec. *Test feeding in sec.* 1	2	3	4	Tweede toetspl. *Second testplant*
1 Juli 1954	1	18	50	21	20	19	+
	2	23	34	**19**	**22**	**18**	
	3	19	24	11	17	18	+
8 Juli 1954	1	19	28	19	69	19	+
	2	36	**19**	**11**	28	**16**	+
	3	25	19	**14**	**22**	14	+
	4	18	**29**	14	21	17	+
	5	26	127	18	28	9	+
	6	75	120	21	18	25	+
	7	41	**18**	32	**15**	**12**	
	8	13	**20**	24	**17**	**16**	
	9	16	18	**13**	**46**	18	
	10	29	**18**	8	11	–	+
15 Juli 1954	1	19	**157**	**15**	7	–	+
	2	35	**23**	**11**	**12**	**12**	+
	3	29	22	**15**	**17**	**15**	+
	4	198	19	26	12	13	+
	5	100	16	**22**	19	**17**	+
	6	27	**17**	14	21	**42**	+
	7	28	**16**	**13**	**11**	–	+
22 Juli 1954	1	36	19	15	**26**	**15**	
	2	57	**23**	65	**19**	**17**	+
	3	17	**44**	36	9	18	+
	4	29	**17**	**76**	**19**	**14**	+
	5	24	**22**	**18**	**23**	**18**	+
	6	17	**10**	17	16	56	
	7	57	21	13	**12**	**10**	+
	8	13	**15**	**11**	**14**	**12**	
29 Juli 1954	1	20	17	**18**	**15**	16	+
	2	18	**18**	16	**15**	**13**	+
	3	21	**19**	**13**	**16**	**12**	+
	4	20	**16**	16	15	14	+
	5	20	7	5	15	13	+
	6	27	29	12	18	15	+
	7	29	**44**	15	28	15	+
	8	33	**109**	**48**	–	–	+
	9	24	**16**	**13**	23	18	
5 Aug. 1954	1	99	**17**	58	17	14	+
	2	17	**78**	19	15	**62**	
	3	53	**49**	**101**	21	33	+
	4	15	**11**	**11**	7	**50**	+
	5	21	14	**27**	**20**	14	+
	6	17	14	13	11	21	

Serie 7. *Phaseolus-virus 1* st. W; inoculatie besmettingsbron 22 Juni 1954
Series 7. *infection source inoculated June 22nd, 1954*
vector: *Aphis fabae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetspl. in sec. *Test feedings in sec.*				Tweede toetspl. *Second testplant*
			1	2	3	3	
1 Juli 1954	1	18	17	21	**19**	20	+
8 Juli 1954	1	19	**25**	24	19	22	
	2	20	**15**	18	23	20	+
	3	19	21	18	50	**25**	
	4	17	27	**16**	**29**	22	
	5	19	**20**	–	–	–	
	6	25	**26**	**19**	**21**	15	+
15 Juli 1954	1	36	**25**	50	35	34	
	2	18	22	**19**	15	19	
	3	32	20	**14**	17	20	
	4	21	**26**	**21**	23	**23**	
	5	32	**22**	**23**	–	–	
	6	22	**26**	**15**	**25**	29	+
22 Juli 1954	1	22	**47**	**21**	**20**	5	
	2	20	**23**	9	27	18	
	3	37	**17**	**23**	20	**21**	
	4	18	18	18	17	15	+
29 Juli 1954	1	22	12	**15**	**22**	**18**	+
	2	13	**20**	18	18	18	
	3	20	13	**19**	15	15	
	4	19	**19**	19	**25**	34	
	5	23	12	36	14	19	+
	6	18	16	**13**	**18**	13	
	7	22	**16**	20	–	–	+
5 Aug. 1954	1	24	**15**	12	**17**	–	
	2	22	**21**	19	17	16	
	3	19	18	14	11	**14**	
	4	19	12	**10**	15	**190**	

SERIE 10. *Phaseolus-virus 1* st. RM inoculatie besmettingsbron 13 Januari 1954
SERIES 10. *infection source inoculated January 13th, 1954*
vector: *Myzus persicae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetsplant in sec. *Test feedings in sec.* 1	2	3	4
21 Jan. 1954	1	15	15	**15**	15	4
	2	15	15	**15**	15	15
	3	15	11	**15**	11	15
	4	10	15	**15**	15	15
28 Jan. 1954	1	15	15	**15**	**15**	15
	2	15	**15**	**15**	15	–
	3	15	15	15	**15**	15
	4	15	15	15	**15**	**15**
	5	15	15	**15**	15	7
	6	15	15	**15**	**15**	15
4 Febr. 1954	1	15	15	**15**	**15**	**15**
	2	15	**6**	6	**15**	**15**
	3	15	15	**15**	**15**	15
	4	15	15	**15**	15	**15**
	5	15	15	**15**	15	11
	6	15	**15**	15	15	14
11 Febr. 1954	1	15	15	8	**15**	**11**
	2	13	**9**	15	12	**15**
	3	15	15	**5**	8	13
	4	15	15	15	**15**	12
	5	15	**15**	**15**	**13**	**15**
	6	12	**15**	**9**	**13**	13
18 Febr. 1954	1	15	**14**	**10**	**15**	14
	2	15	**11**	15	13	**15**
	3	15	13	**13**	8	4
	4	15	15	15	**15**	15
	5	15	15	**15**	15	15
26 Febr. 1954	1	15	**15**	15	**15**	14
	2	15	15	13	**15**	15
	3	15	15	**15**	**15**	**15**
	4	15	15	**15**	**15**	**15**
	5	15	12	13	**15**	**10**
	6	15	**15**	15	15	9
	7	15	**15**	15	15	11
	8	15	**15**	15	15	**15**
	9	15	**15**	**15**	**8**	10
4 Mrt 1954	1	15	**15**	12	8	15
	2	15	15	**15**	15	15
	3	9	15	15	15	**15**
	4	15	15	**15**	5	15
	5	15	15	15	**15**	11
	6	15	15	**15**	7	10

SERIE 11. *Phaseolus-virus 1* st. RM inoculatie besmettingsbron 13 Januari 1954
SERIES 11. *infection source inoculated January 13th, 1954*
vector: *Aphis fabae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetsplant in sec. *Test feedings in sec.*			
			1	2	3	4
22 Jan. 1954	1	15	9	15	**15**	15
	2	15	**15**	9	13	15
28 Jan. 1954	1	15	**14**	**15**	15	15
4 Febr. 1954	1	15	**15**	15	15	15
	2	15	**15**	15	15	12
	3	15	**15**	15	15	15
	4	15	15	15	15	**15**
11 Febr. 1954	1	15	**15**	14	12	11
	2	15	**13**	11	15	13
	3	14	**15**	**15**	15	15
	4	15	10	15	15	**15**
19 Febr. 1954	1	15	**15**	**15**	–	–
	2	15	**15**	**9**	15	15
	3	15	15	6	15	**15**
26 Febr. 1954	1	15	**15**	15	13	15
	2	15	**15**	15	15	15
	3	15	**13**	**15**	15	15
	4	15	**15**	10	8	15
	5	15	**15**	11	15	15
4 Mrt 1954	1	15	**15**	5	9	15

Serie 12. *Phaseolus-virus 1* st. RM inoculatie besmettingsbron 15 Maart 1954
Series 12. *infection source inoculated March 15th, 1954*
vector: *Myzus persicae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetsplant in sec. *Test feedings in sec.*			
			1	2	3	4
1 Apr. 1954	1	15	15	11	**15**	15
	2	15	**12**	**14**	**12**	**10**
	3	13	**7**	**11**	15	3
8 Apr. 1954	1	15	**15**	**15**	**15**	15
15 Apr. 1954	1	14	15	**15**	10	**15**
	2	15	7	9	15	**15**
	3	15	**12**	7	**12**	15
	4	15	15	**12**	15	13
	5	15	12	**15**	15	15
	6	15	**14**	15	14	12
22 Apr. 1954	1	15	**15**	**15**	**8**	13
	2	15	15	15	6	**12**
	3	15	15	**15**	15	15
	4	15	**15**	**15**	15	**15**
	5	13	**15**	15	15	9
	6	15	**15**	15	7	**15**
	7	15	**15**	15	15	15
29 Apr. 1954	1	15	15	15	**15**	15
	2	13	13	8	15	**11**
	3	15	15	15	**11**	13
	4	15	**11**	**13**	15	**13**
	5	15	**13**	**12**	15	12
6 Mei 1954	1	12	15	**11**	15	11
	2	15	8	12	**15**	12
	3	15	**15**	15	15	12
	4	15	**15**	14	15	13
	5	15	**15**	11	12	**15**
	7	13	14	15	**15**	15
	7	15	**13**	9	**15**	15
	8	15	**15**	10	**13**	11
	9	15	12	**13**	9	12
	10	15	**14**	12	11	**8**

Serie 13. *Phaseolus-virus 1* st. RM inoculatie besmettingsbron 15 Maart 1954
Series 13. *infection source inoculated March 15th, 1954*
vector: *Aphis fabae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetsplant in sec. *Test feedings in sec.*			
			1	2	3	4
1 Apr. 1954	1	15	15	**15**	15	15
	2	15	15	15	15	**15**
	3	15	10	13	13	**13**
	4	15	15	15	**15**	10
15 Apr. 1954	1	15	**15**	15	15	15
	2	15	15	**15**	15	15
22 Apr. 1954	1	15	**15**	15	15	15
6 Mei 1954	1	15	**15**	14	15	14
	2	15	**15**	15	15	**15**
	3	15	**14**	15	15	**15**
	4	15	15	13	15	**15**
13 Mei 1954	1	15	**15**	11	15	–
	2	15	**15**	**15**	12	11
	3	15	15	11	**14**	**12**

SERIE 14. *Phaseolus-virus 1* st. RM inoculatie besmettingsbron 22 Juni 1954
SERIES 14. *infection source inoculated June 22nd, 1954*
vector: *Myzus persicae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetspl. in sec. *Test feedings in sec.*				Tweede toetspl. *Second testplant*
			1	2	3	4	
2 Juli 1954	1	20	18	17	32	16	+
	2	20	20	**21**	**28**	**9**	+
	3	26	19	12	16	13	+
	4	16	**20**	15	**20**	**25**	+
	5	25	**36**	**15**	**19**	17	+
	6	18	18	**10**	19	44	+
	7	17	29	18	**20**	20	+
	8	26	**25**	**14**	14	16	+
	9	16	21	79	9	14	+
	10	19	16	20	31	10	+
9 Juli 1954	1	31	**17**	17	20	12	+
	2	19	16	**135**	21	13	+
	3	45	15	**15**	**17**	15	+
	4	26	**18**	69	**26**	10	+
	5	23	**17**	15	**17**	**19**	+
	6	19	17	9	**18**	7	+
	7	15	13	18	–	–	+
	8	40	17	**18**	**10**	**107**	+
	9	17	**16**	32	**15**	**13**	+
	10	33	**12**	10	15	**9**	+
	11	109	10	16	**60**	–	+
16 Juli 1954	1	25	33	**22**	14	25	+
	2	125	79	**51**	23	14	
	3	15	**16**	**17**	**14**	–	+
	4	18	20	117	–	–	+
	5	24	19	114	12	–	+
	6	19	**17**	19	**18**	**121**	
	7	27	**23**	12	**27**	75	+
	8	17	**16**	13	16	**16**	
	9	19	**18**	15	19	–	+
	10	22	**23**	**14**	21	–	
23 Juli 1954	1	74	16	55	**65**	**65**	+
	2	21	**18**	21	11	18	
	3	34	**19**	19	**19**	**17**	+
	4	16	18	16	**15**	**16**	+
	5	22	18	17	**15**	**36**	+
	6	14	17	**35**	**14**	**46**	+
	7	14	**26**	**31**	36	16	
	8	20	**17**	17	45	–	+
	9	26	25	22	16	22	+
	10	36	13	**17**	21	17	
	11	24	17	12	21	**11**	+
	12	10	**20**	**14**	**22**	**12**	+
30 Juli 1954	1	22	**22**	**37**	**9**	**44**	+
	2	25	**29**	**15**	23	**13**	+
	3	72	27	**17**	19	28	+
	4	59	22	25	28	–	+
	5	18	19	**27**	14	**12**	+
	6	35	**16**	15	19	**18**	+
	7	22	17	**25**	12	**27**	+
	8	55	**59**	**24**	18	18	+
6 Aug. 1954	1	22	20	**21**	**13**	**48**	+
	2	26	**18**	20	16	9	
	3	31	**76**	46	16	29	
	4	12	27	**13**	**19**	13	+
	5	36	23	20	27	54	+
	6	43	14	**15**	**18**	21	+

SERIE 15. *Phaseolus-virus 1* st. RM inoculatie besmettingsbron 22 Juni 1954
SERIES 15. *infection source inoculated June 22nd, 1954*
vector: *Aphis fabae*

Datum van proef *Date of experiment*	No. luis *aphid*	Zuigtijd op besmettingsbron in sec. *Infection feeding in sec.*	Zuigtijden op toetspl. in sec. *Test feedings in sec.*				Tweede toetspl. *Second testplant*
			1	2	3	4	
2 Juli 1954	1	17	**23**	–	–	–	+
	2	12	**15**	21	8	15	
9 Juli 1954	1	21	18	13	**13**	15	+
	2	21	**17**	14	**17**	13	
	3	26	21	**24**	21	22	
	4	46	**18**	**24**	18	14	
	5	19	**16**	22	19	19	
23 Juli 1954	1	14	**19**	17	**14**	16	+
	2	16	13	**18**	**22**	9	
	3	19	25	6	**22**	–	
	4	37	21	17	20	19	+
	5	57	13	19	16	17	
	6	40	**16**	21	13	18	+
30 Juli 1954	1	23	9	**12**	**20**	**16**	+
	2	15	**26**	15	**17**	14	
6 Aug. 1954	1	18	**14**	7	13	14	
	2	16	**50**	18	24	27	
	3	11	**14**	13	**22**	16	

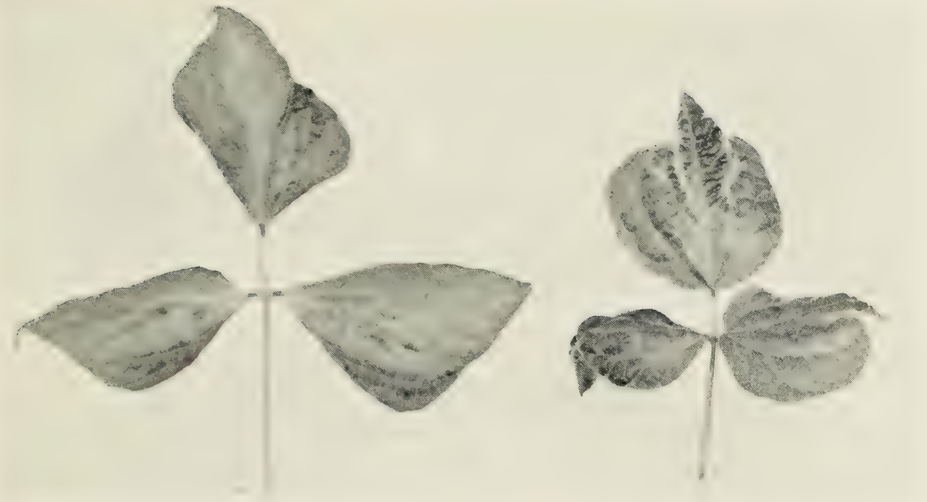


Fig. 1. Bladeren van het bonenras Beka besmet met *Phaseolus-virus 1;* links stam RM, rechts stam W. Symptoom: rolmozaiek.

Leaves of Beka beans infected with Phaseolus virus 1, at left strain RM, at right strain W. Symptom: common bean mosaic.

Fig. 2. Beka-plant, waarvan de enkelvoudige bladeren een maand eerder met *Phaseolus-virus 1* stam W werden geïnoculeerd. Locale reactie van enkelvoudige bladeren; rolmozaiek in nieuw gevormde scheuten.

Beka plant whose primary leaves were inoculated one month earlier with Phaseolus virus 1 strain W. Local reaction of primary leaves; common bean mosaic in newly formed shoots.

Fig. 3. Afsterving van de top van een Beka-plant, die drie weken eerder met *Phaseolus-virus 1* werd geïnoculeerd. Steengrauw in jong blad.

Top necrosis of Beka plant inoculated three weeks earlier with Phaseolus virus 1. Acute „steengrauw" symptoms in young leaf.

Fig. 4. Oudere Beka-plant, die een maand eerder met *Phaseolus-virus 1* stam W werd geïnoculeerd. Hevig steengrauw; peul met aalstreep.

Beka plant inoculated one month earlier at a late stage of its development with Phaseolus virus 1. Note heavy „steengrauw" of leaves and lighter stripe along the length of the pod.

Fig. 5. Bonenplant (bastaard) van het veld met symptomen van zwartevaatziekte.
Field-grown hybrid bean plant showing symptoms of „black root".

Fig. 6. Peulen van het bonenras Servus van het veld, onder afkomstig van een zwartevaatzieke plant, boven van een gezonde plant.

Pods of the bean variety Servus from field-grown plants, lower: from a plant showing „black root", upper: from a healthy plant.

Fig. 8. Blad van een Servus-plant, afkomstig van het veld, met eerste symptoom van de zwartevaatziekte: locale reactie op *Phaseolus-virus 1*.

Leaf of field-grown Servus bean plant showing local reaction to Phaseolus virus 1, the initial symptom of „black root".

Fig. 10. Blad van het bonenras Beka, besmet met *Phaseolus-virus 2* stam D. Symptoom: scherpmozaiek.

Leaf of the bean variety Beka, infected with Phaseolus virus 2 strain D. Symptom: yellow bean mosaic.

Fig. 11. Chlorotische vlekjes op het blad van het bonenras Servus, dat 10 dagen eerder met *Phaseolus-virus 2* stam TN was geïnoculeerd.

Local chlorotic spots on a leaf of bean variety Servus inoculated 10 days earlier with Phaseolus virus 2 strain TN.

Fig. 13. Bladeren van Beka, geïnoculeerd met het virus, geïsoleerd van witte klaver. A: 5 dagen na de inoculatie; B: 14 dagen na de inoculatie.

Beka leaves inoculated with the virus isolated from white clover. A: 5 days after inoculation; B: 14 days after inoculation.

Fig. 14. Blad van Beka met verspreidingssymptomen van het virus, geïsoleerd uit witte klaver.

Beka leaf showing systemic symptoms from the virus isolated from white clover.

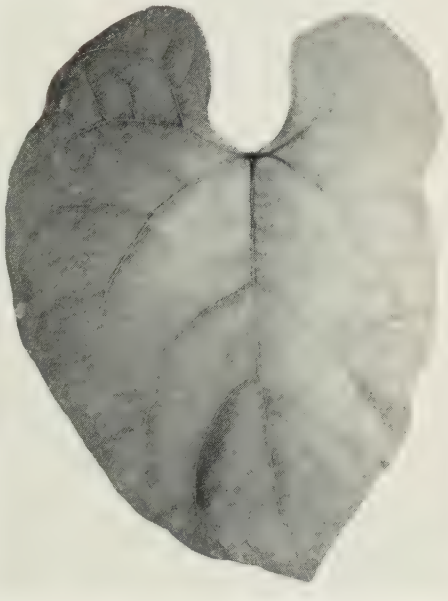
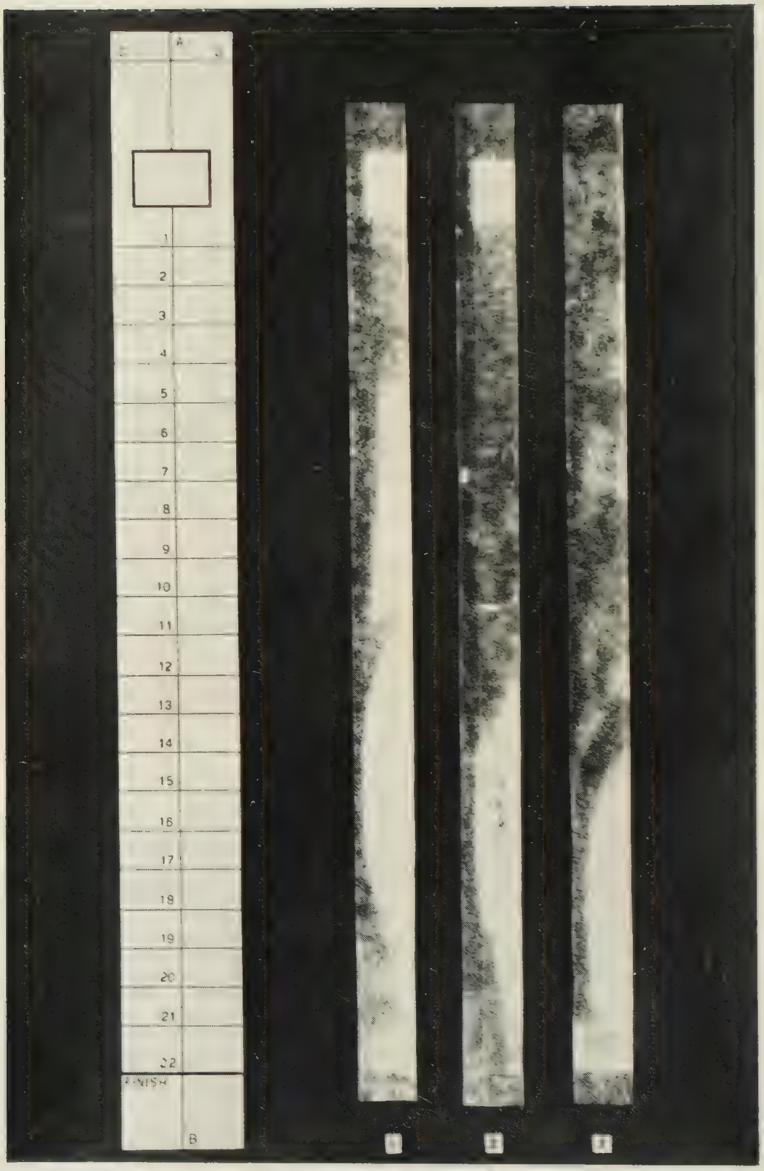


Fig. 15. Beka-blad met verkleuring op de plek, waar *Phaseolus-virus 1* stam W door *Myzus persicae* is ingebracht.

Beka leaf with discoloration of the area surrounding the point of inoculation of Phaseolus virus 1 strain W by Myzus persicae.



a b

Fig. 18a. Strook filtreerpapier, zoals gebruikt bij het papierchromatografisch onderzoek van het sap van gezonde bonen en bonen, respectievelijk besmet met *Phaseolus-virus 1*, *Phaseolus-virus 2* en een virus geïsoleerd uit witte klaver.

Strip of filterpaper as used in the paperchromatography of sap from healthy beans and from beans infected with Phaseolus virus 1, Phaseolus virus 2 and a virus isolated from white clover.

Fig. 18b. Foto's in ultraviolet licht van 265 mμ van de volgende chromatogrammen:
1. ongecentrifugeerd sap van Servus-plant besmet met *Phaseolus-virus 2* stam TN.
2. Hetzelfde sap, niet gecentrifugeerd, maar verdund met 2 delen gedestilleerd water.
3. Hetzelfde sap, onverdund, na centrifugering bij 12.000 t.p.m. gedurende 45 min.

Photograms made with ultra-violet light of 265 mμ from the following chromatograms:
1. *Uncentrifuged sap from Servus plant infected with Phaseolus virus 2 strain TN.*
2. *The same sap, uncentrifuged but diluted with two volumes of distilled water.*
3. *The same sap undiluted, but after centrifugation at 12,000 r.p.m. for 45 min.*

Fig. 19. Draadvormige deeltjes in het extract uit strook 10–10,5 van een chromatogram van gecentrifugeerd sap van Beka besmet met een virus geïsoleerd uit witte klaver. De in Fig. 19 t/m 24 gereproduceerde electronenfoto's zijn vervaardigd door Mejuffrouw C. van der Scheer, phys. dra. op de Afd. Electronenmicroscopie van het Laboratorium voor Natuur- en Weerkunde te Wageningen. De vergroting van alle electronenfoto's is 25.000 ×.

Thread-like particles from the extract from zone 10–10.5 of the chromatogram of centrifuged sap from Beka infected with a virus isolated from white clover. The electron-micrograms reproduced in Figures 19–24 were made by Miss C. van der Scheer, Department of Electron-microscopy, Laboratory for Physics and Meteorology at Wageningen. The magnification of all electron-micrograms is × 25.000.

Fig. 20. Ineengestrengelde draadvormige deeltjes in het extract uit strook 10,5–12 van een chromatogram van gecentrifugeerd sap van Beka besmet met *Phaseolus-virus 1* stam RM.

Thread-like particles slightly aggregated in groups. From the extract from zone 10.5–12 of the chromatogram of centrifuged sap from Beka beans infected with Phaseolus virus 1 strain RM.

Fig. 21. Draadvormige deeltjes gedeeltelijk onder een laag zeer fijn materiaal. Afkomstig uit zone 5,5–7 van een chromatogram van gecentrifugeerd sap van Beka besmet met *Phaseolus-virus 1* stam W.

Thread-like particles partly obscured by a layer of very fine material. From extract from zone 5.5–7 of the chromatogram of centrifuged sap from Beka beans infected with Phaseolus virus 1 strain W.

Fig. 22. Grove en fijne amorfe bestanddelen in extract uit strook 8–12 van een chromatogram van niet gecentrifugeerd sap van gezonde Beka.

Coarse and fine amorphous particles. From extract from zone 8–12 of the chromatogram of uncentrifuged sap from healthy Beka plants.

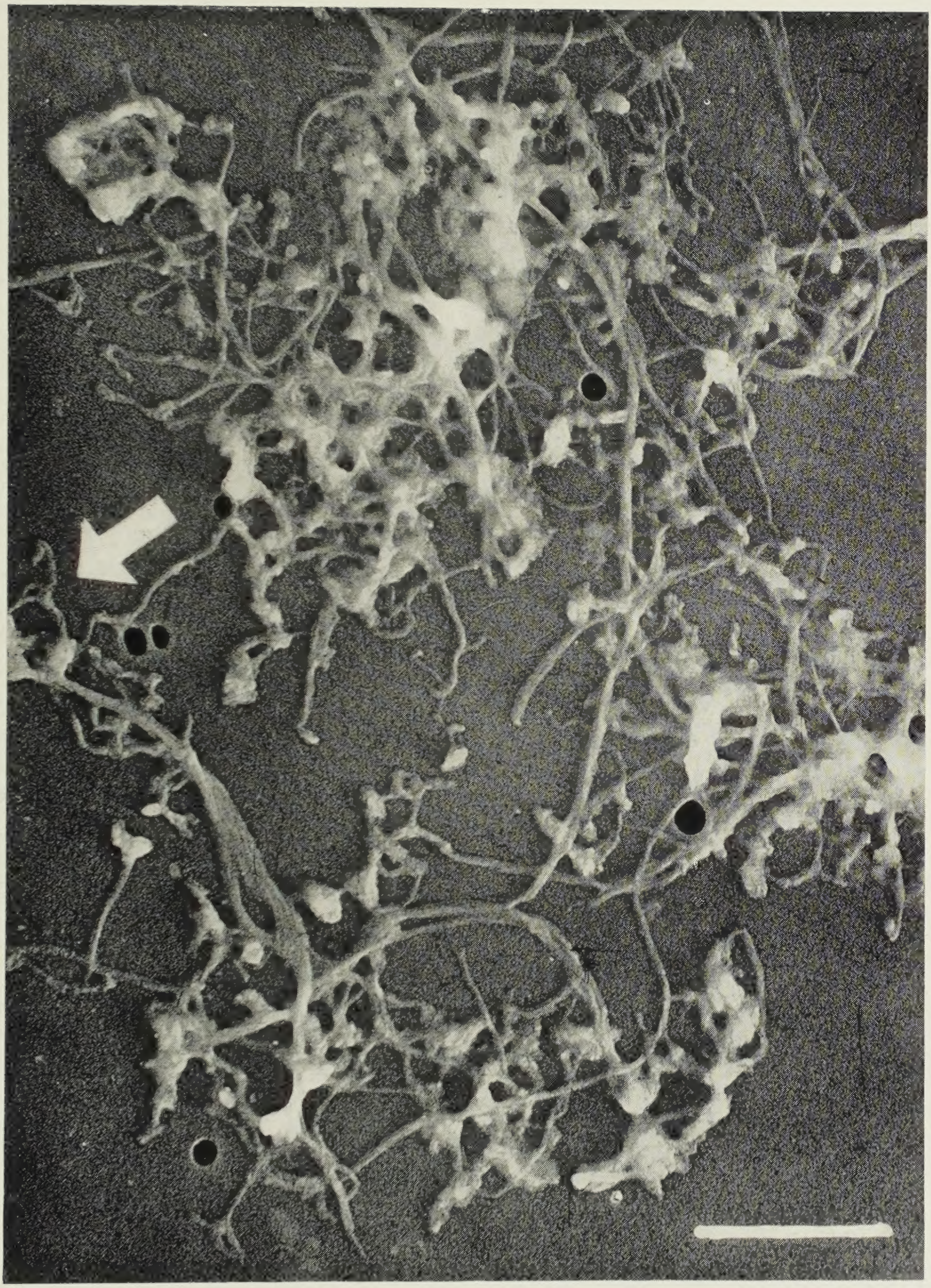


Fig. 23. Draadvormige deeltjes, die sterk geaggregeerd zijn tot in elkaar gedraaide strengen en geassocieerd met grove amorphe deeltjes. Een gedeeltelijk tot dunnere deeltjes ontwarde streng is aangegeven door een pijl. In extract uit strook 5–6,5 van een chromatogram van niet gecentrifugeerd, verdund sap van Servus besmet met *Phaseolus-virus 2* stam TN.

Thread-like particles strongly aggregated into curled skeins and associated with coarse amorphous material. A skein partly disentangled and showing thin, possibly single threads is indicated by an arrow. From extract from zone 5–6.5 of the chromatogram of uncentrifuged diluted sap from Servus beans infected with Phaseolus virus 2 strain TN.

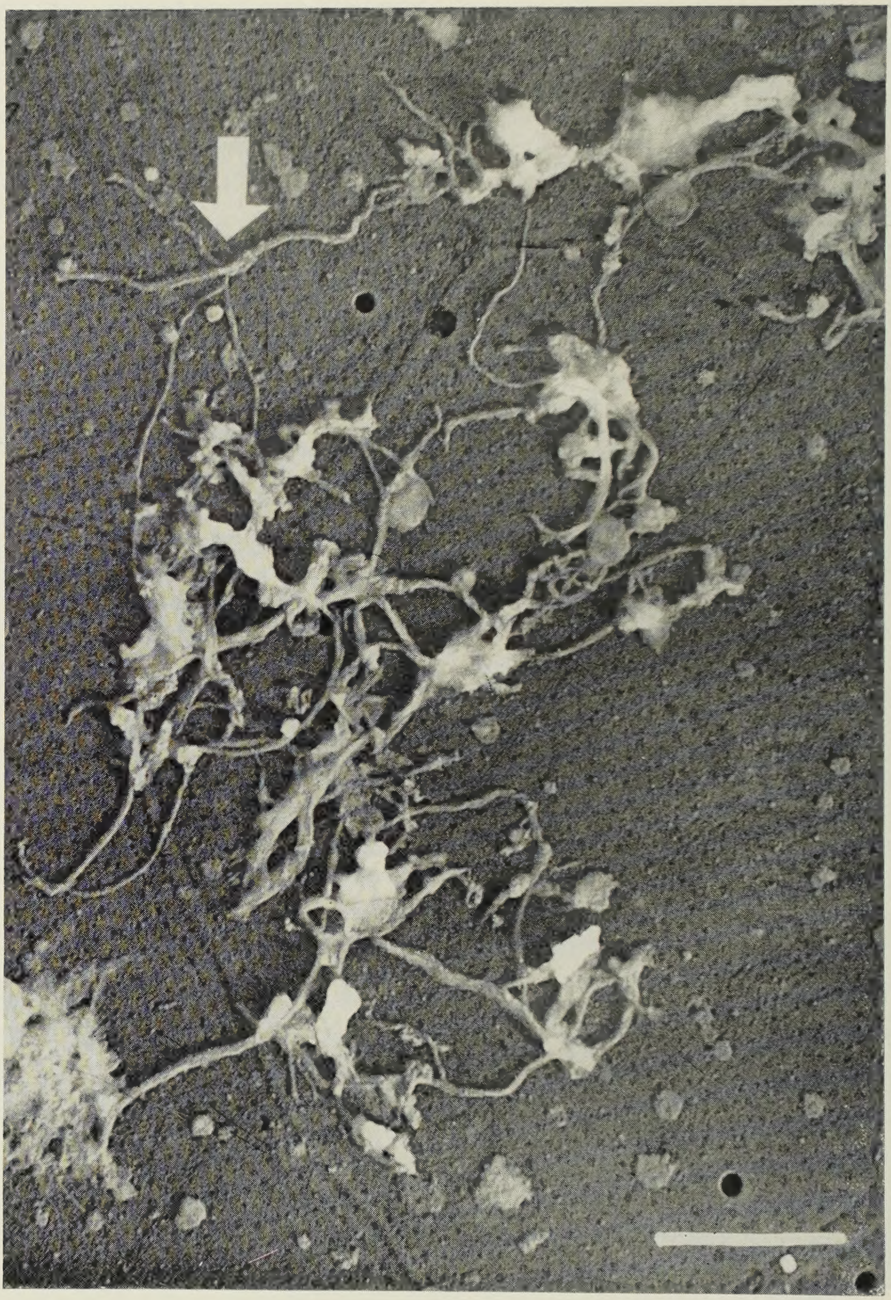


Fig. 24. Draadvormige deeltjes, die sterk geaggregeerd zijn tot in elkaar gedraaide strengen en geassocieerd met grove amorphe deeltjes. Een gedeeltelijk tot dunnere deeltjes ontwarde streng is aangegeven door een pijl. In extract uit strook 10–11,5 van een chromatogram van niet gecentrifugeerd, verdund sap van Beka, besmet met *Phaseolus-virus 2* stam D.

Thread-like particles strongly aggregated into curled skeins and associated with coarse amorphous material. A skein partly disentangled and showing thin, possibly single threads is indicated by an arrow. From extract from zone 10–11.5 of the chromatogram of uncentrifuged diluted sap from Beka beans infected with Phaseolus virus 2 strain D.

Mededelingen van het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek
Contributions of the Institute for Phytopathological Research
Binnenhaven 4*a*, Wageningen, Netherlands

No 45. GROSJEAN, J., Natuurlijk herstel van loodglansziekte (Natural recovery from silver-disease). Tijdschrift over Plantenziekten, 58:109-120, 1952. Prijs f 0,35.

No 46. NOORDAM, D., Virusziekten bij chrysanten in Nederland (Virus diseases of chrysanthemum indicum in the Netherlands. Tijdschrift over Plantenziekten, 58:121-190, 1952. Prijs f 3,—.

No 47. TJALLINGII, F., Onderzoekingen over de mozaïekziekte van de augurk (Cucumis Sativus L.). (Investigations on the mosaic disease of gherkin (Cucumis sativus L.). 1952. Prijs f 3,50.

No 48. MOOI-BOK, M. B., Het Thielaviopsis-wortelrot van Lathyrus Odoratus L. (bodemmoeheid). Thielaviopsis-rootrot of lathyrus odoratus L. (Soil sickness). 1952. Prijs f 2,30.

No 49. THUNG, T. H., Waarnemingen omtrent de dwergziekte bij framboos en wilde braam (Observations on the Rubus stunt disease in raspberries and wild blackberries). Tijdschrift over Plantenziekten, 58:255-259, 1952. Prijs f 0,25.

No 50. THUNG, T. H., Herkenning en genezing van enige Virusziekten (Diagnosis and curing of some virus diseases). Med. van de Directeur van de Tuinbouw 15, 1952: 714-721. Prijs f 0,35.

No 51. HOOF, H. A. VAN, Stip in kool, een virusziekte („Stip" (specks) in cabbage, a virus disease). Med. van de Directeur van de Tuinbouw 15, 1952: 727-742. Prijs f 0,50.

No 52. s'JACOB, J. C., Doel en werkzaamheden van de Afdeling Resistentie-Onderzoek van het I.P.O. (Objectives and duties of the Plant Disease Resistance Department of the Institute of Phytopathological Research (I.P.O.). Med. van de Directeur van de Tuinbouw 15, 1952: 758-772. Prijs f 0,50.

No 53. SEINHORST, J. W., Aaltjesziekten in tuinbouwgewassen (Eelworms menacing horticultural crops) Med. v. d. Dir. v. d. Tuinbouw 15, 1952: 773-776. Prijs f 0,25.

No 54. BAKKER, MARTHA, Phomopsisziekte in zaadwortelen (Control of the Phomopsis disease in seedumbels of carrot). Med. van de Directeur van de Tuinbouw 15, 1952 879-883. Prijs f 0,30.

No 55. MAAN, W. J., 5 Jaren landbouwluchtvaart (5 Years of agricultural aviation). Mededelingen Directeur van de Tuinbouw 15, 1952: 953-958. Prijs f 0,30.

No 56. KRIJTHE, J. M., Onderzoekingen over mozaïek of bontbladigheid van perzik- en pruimebomen (Investigations on a virus disease of peaches and plums). Tijdschrift over Plantenziekten, 59: 51-61, 1953. Prijs f 0,35.

No 57. EVENHUIS, H. H., Bepaling van de tijdstippen waarop tegen het fruitmotje, Enarmonia (carpocapsa) pomonella L., gespoten moet worden (Determination of the dates of spraying against the codling moth). Tijdschrift over Plantenziekten, 59: 9-22, 1953. Prijs f 0,50.

No 58. FRANSSEN, C. J. H., Levenswijze en bestrijding van de erwten-bladrandkever (The control of Sitona Lineatus). Landbouwvoorlichting, 10. 2: 72-79, 1953. Prijs f 0,30.

No 59. FLUITER, H. J. DE, F. A. VAN DER MEER, Waarnemingen omtrent enkele bladluizen van framboos en braam (Rhynch., Aph.) (Observations on some Rubus-aphids). Verslag 84ste Wintervergadering Ned. Ent. Ver. 24-2-1952, pag. 107-112. Prijs f 0,30.

No 60. ROOSJE, G. S. and J. B. M. VAN DINTHER, The genus Bryobia and the species Bryobia praetiosa Koch. Prijs f 0,35.

No 61. HOUTEN, J. G. TEN, Luchtverontreiniging door industriegassen en de nadelige gevolgen voor land- en tuinbouw (Air pollution caused by industrial smoke and its effect on agriculture and horticulture). Mededelingen Directeur van de Tuinbouw 16, 1953: 675-688. Prijs f 0,65.

No 62. FRANSEN, J. J. en M. C. KERSSEN, Werking van Parathionresidu's op diverse koolsoorten (Activity of the residues of parathion on leaves of different kinds of cabbage). Med. v. d. Landbouwhogeschool en de Opzoekingsstations van de Staat te Gent. 18(2): 422-438. 1953. Prijs f 0,50.

No 63. BRUINSMA, F. en LABRUYÈRE Ir. R. E., Bestrijding van de vlekkenziekte in zaadbonen (Colletotrichum lindemuthianum). Control of the Anthracnose (Colletotrichum lindemuthianum) in sead beans. Mededelingen Directeur van de Tuinbouw 16, 1953: 243-252. Prijs f0,65.

No 64. FLUITER, H. J. DE en F. A. VAN DER MEER, Rubus stunt, a leafhopper-borne virus disease. (De dwergziekte van de framboos, een virusziekte, die door cicadelliden wordt overgebracht.) Tijdschrift over Plantenziekten, 59: 195–197, 1953. Prijs No 64 en 65 samen f 0,40.

No 65. MEER, F. A. VAN DER, De incubatie-tijd van de dwergziekte bij verschillende frambozenrassen. (On the incubation period of Rubus stunt in some raspberry varieties.) Tijdschrift over Plantenziekten, 60: 69–71, 1954. Prijs No 64 en 65 samen f 0,40.

No 66. BAKKER, M., Een bladvlekkenziekte van prei, veroorzaakt door Pleospora herbarum (Pers.) Rabenh. (A leafspot disease of leek (Allium porium L.) caused by Pleospora herbarum (Pers.) Rabenh.) Tijdschrift over Plantenziekten, 59: 25–26, 1953. Prijs f 0,25.

No 67. BRUIN-BRINK, G. DE, H. P. MAAS GEESTERANUS en D. NOORDAM, Lycopersicum-virus 3 (tomato spotted wilt virus), oorzaak van een ziekte bij Nicotiana tabacum en Impatiens holstii (Lycopersicum-virus 3 (tomato spotted wilt virus), on Nicotiana tabacum and Impatiens holstii. Tijdschrift over Plantenziekten 59:240-244, 1953. f0,45.

No 68. KOLE, A. P., A contribution to the knowledge of Spongospora subterranea (Wallr.) Lagerh., the cause of powdery scab of potatoes (Bijdrage tot de kennis van Spongospora subterranea (Wallr.) Lagerh., de verwekker van poederschurft bij aardappelen. Tijdschrift over Plantenziekten, 60: 1–65, 1954. Prijs f 2,10.

No 69. TEN HOUTEN, J. G., Enige resultaten van het werk van I.P.O.-onderzoekers (some results of the work at the Institute for Phytopathological Research). Mededelingen Directeur van de Tuinbouw 17, 1954: 78-93. Prijs f 0,65.

No 70. FRANSSEN, C. J. H. De levenswijze en de bestrijdingsmogelijkheden van de erwtenpeulboorder. (The biology and control of Enarmonia Nigricana F.) Versl. Landbouwk. Onderz. No 60.2 - 's-Gravenhage - 1954. Prijs f 2,—.

No 71. FRANSSEN C. J. H., De levenswijze en de bestrijdingsmogelijkheden van de erwtenknopmade. (The biologie and control of Contarinia Pisi Winn.) Versl. Landbouw Onderz. No. 60.3 - 's-Gravenhage - 1954 Prijs f1,40.

No 72. DE FLUITER, H. J., Phaenologische waarnemingen betreffende de aardbeiknotshaarluis (Pentatrichopus fragaefolii Cock.,) in Nederland. (Observations on the phaenology of the Strawberry aphid, Pentatrichopus fragaefolii Cock., in the Netherlands). Entomologische berichten, Deel 15, 1. IV. 1954 Prijs f 0,40.

No 73. WALRAVE, Ir J., Proeven met systemische insecticiden I. (Experiments with systemic insecticides I). Tijdschrift over Plantenziekten, 60: 93-108, 1954. Prijs f 0,90.

No 74. FRANSSEN, C. J. H., De schadelijke insecten en mijten van onze Nederlandse Peulvruchten. „15 Jaren P.S.C.", p. 108-154, 1954 (Jubileumuitgave Peulvruchten Studie Combinatie, Wageningen ter gelegenheid van het derde lustrum. 1954). Prijs f 1,10.

No 75. BAKKER, MARTHA, Proeven ter bestrijding van rotting van witlofwortels veroorzaakt door Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) Massee. Mededelingen Directeur van de Tuinbouw 17, 1954: 356-361. Prijs f 0.30.

No 76. NIJVELDT, W., Galmuggen van Cultuurgewassen (I Galmuggen van fruitgewassen, zie I.P.O. Med. nr. 41) II. III, IV, en V resp. Galmuggen schadelijk voor de groenteteelt, boomteelt, landbouwgewassen en sierteelt en Enige gegevens over Rhabdophaga triandraperda f.n.sp., een galmug schadelijk voor de griendcultuur (Gall midges on culture crops (I on fruitcrops see I.P.O. Med. 41) II, III, IV and V Gall midges on vegetable crops, trees, agricultural crops and ornamental plants and Some notes on Rhabdophaga triandraperda f.n.sp. a gall midge injurious to osiers.) Tijdschrift over Plantenziekten, 59:77-81 en 137-142, 1953; 60:83-92 en 152-156; 1954. Ent. Ber. 14:355-358, 1953. Prijs f 0.90.

No 77. BRUINSMA, F. en J. W., SEINHORST, Warmwaterbehandeling van sjalotten tegen aantasting door stengelaaltjes (Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev). (Hot water treatment of shallots against attack by the stem and bulb eelworm Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev. Mededelingen Dir. v. d. Tuinbouw 17, 1954; 437–446. Prijs f 0,35.

No 78. HUBBELING, Ir N., Een virus als oorzaak van de zogenaamde voetziekte bij erwten. Zaadbelangen, nr 14, 1954. Prijs no 78 en 79 samen f 0,75.

No 79. s'JACOB, Dr J. C., Doel en werkwijze van de resistentie afdeling van het I.P.O. Landbouwvoorlichting 11. 8. 385–394, 1954. Prijs no 78 en 79 samen f 0,75.

No 80. BEEMSTER, A. B. R., Virustransport innerhalb der Kartoffelpflanze. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Berlin-Dahlem, Heft 80, 1954. 29. Pflanzenschutz-Tagung der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig in Heidelberg, 5–9 Oktober 1953 p. 136–143.

No 81. WALRAVE, J., Proeven met systemische insecticiden II. (I zie Med. 73) (Experiments with systemic insecticides II). Tijdschrift over Plantenziekten, 60: 205–220, 1954. Prijs f 0.40.

No 82. ANKERSMIT, G. W. en H. D. VAN NIEUKERKEN, De invloed van temperatuur en wind op het vliegen van de koolzaadsnuitkever Ceuthorrhynchus assimilis Payk (The effect of temperature and wind on the flight of Ceuthorrhynchus assimilis Payk). Tijdschrift over Plantenziekten, 60: 230–239, 1954. Prijs f 0,35.

No 83. HUBBELING, N., Ziekten en beschadigingen van bonen. (Bean diseases and pest). Tuinbouwvoorlichting 3, 1955 82 pp. Prijs f 2,25.

No 84. RAGETLI, H. W. J. en J. P. H. VAN DER WANT. Paper chromatography of plant viruses. Proceedings Kon. Ned. Ak. v. Wetenschappen, Amsterdam. Series C 57 (5): 621-627, 1954. Prijs f 0.35.

No 85. WANT, J. P. H. VAN DER, Onderzoekingen over virusziekten van de boon (Phaseolus vulgaris L.). (Investigations on virus diseases of the bean, Phaseolus vulgaris L.). Wageningen 1954. 84 pp & 12 pp fig. Prijs f 2,50.